

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana – Maria – Beatrice Šikić

Rast i fotosinteza vodene leće (*Lemna minor* L.) pri različitim izvorima svjetlosti

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za Fiziologiju bilja u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

ZAHVALA

Zahvaljujem svima koji su pridonijeli izradi ovog diplomskog rada, posebice mentorici izv. prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek, koja mi je svojim savjetima i sugestijama pomogla pri razumijevanju rezultata i pisanju ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom svih godina mog studiranja. Najveće hvala pomoćnoj voditeljici dr. sc. Mariji Babić, koja je uz mene bila od samog početka rada, hvala na velikoj pomoći i podršci, svim savjetima, objašnjenjima i ugodnim razgovorima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Rast i fotosinteza vodene leće (*Lemna minor* L.) pri različitim izvorima svjetlosti

Ana – Maria – Beatrice Šikić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom radu istražen je utjecaj fluorescentne i LED rasvjete na rast i fotosintezu vodene leće (*Lemna minor* L.). Biljke su uzgajane 14 dana u dvije supkulture, na dvjema različitim hranjivim podlogama - hranjivoj podlozi po Steinbergu te hranjivoj podlozi po Pirsonu i Seidelu. Tip rasvjete značajnije je utjecao na rezultate nego sastav hranjive podloge. Tako su prirast broja biljaka, mase svježe tvari te prirast broja kolonija kao i ukupna površina biljaka bili veći pri fluorescentnoj rasvjeti. Na sadržaj proteina i aktivnost enzima gvajakol peroksidaze veći je učinak imao sastav hranjive podloge. Ta su dva parametra bila viša u biljaka koje su rasle na podlozi po Pirsonu i Seidelu što je naročito došlo do izražaja u drugoj supkulturi. Sadržaj fotosintetskih pigmenata bio je u svim grupama biljaka viši u prvoj supkulturi, dok je u drugoj supkulturi utvrđena značajno viša količina pigmenata u biljaka izloženih LED rasvjeti u usporedbi s biljkama uzgajanim na fluorescentnoj rasvjeti. U biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu i pri LED rasvjeti je, u usporedbi s fluorescentnom rasvjetom, uočeno značajno povećanje efektivnog prinosa fotosustava II, stope prijenosa elektrona i fotokemijskog gašenja u drugoj supkulturi. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da je tijekom pokusa rast bio bolji kod biljaka uzgajanih na fluorescentnoj rasvjeti, dok je fotosintetska učinkovitost bila veća kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti.

(56 stranica, 24 slike, 3 tablice, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: vodena leća, fluorescentna rasvjeta, LED rasvjeta, rast, fotosinteza

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

Izv. prof. dr. sc. Tajana Preočanin

Rad prihvaćen: 16. lipnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

The growth and photosynthesis of duckweed (*Lemna minor* L.) under
different light sources

Ana – Maria – Beatrice Šikić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In this experiment the effect of fluorescent and LED light on growth and photosynthesis of duckweed (*Lemna minor* L.) was evaluated. Plants were grown on two different nutrient solutions – Steinberg medium and Pirson and Seidel medium, for 14 days in two subcultures. Light type influenced the results more significantly than the composition of nutrient media. Growth rates based on frond number, fresh weight, number of colonies as well as total plant surface were better under fluorescent light. Protein content and guaiacol peroxidase activity were more influenced by the composition of nutrient media. These two parameters were higher in plants grown on Pirson and Seidel medium, especially in the second subculture. In general, the content of photosynthetic pigments was higher in the first subculture. In the second subculture the content of pigments under LED light exceeded the content of pigments in plants grown under fluorescent light. In plants grown on Steinberg medium and under LED light significant increase of effective quantum yield of photosystem II, electron transport rate and photochemical quenching, compared to fluorescent light, has been noticed in the second subculture. According to obtained results it can be concluded that growth of duckweed plants during 14-days experiment was better under fluorescent light, while the photosynthetic performance was better in plants grown under LED light.

(56 pages, 24 figures, 3 tables, 56 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: duckweed, fluorescent light, LED light, growth, photosynthesis

Supervisor: Željka Vidaković-Cifrek

Reviewers: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Tajana Preočanin, Assoc. Prof.

Thesis accepted: June 16, 2016

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1 Djelovanje svjetlosti na rast i razvitak biljaka	1
1.2 Svjetlost	3
1.3 Fotosinteza	6
1.4 Lemna–test	10
1.4.1 Vodena leća (<i>Lemna minor</i> L.)	10
1.4.2 Izvođenje Lemna–testa	11
2. Cilj istraživanja	14
3. Materijali i metode	15
3.1 Lemna test	15
3.1.1 Određivanje stope rasta biljaka	17
3.1.2 Određivanje prirasta broja kolonija	17
3.1.3 Određivanje prirasta mase biljaka	18
3.1.4 Određivanje površine biljaka	19
3.1.5 Ekstrakcija i određivanje sadržaja topivih proteina i mjerenje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze	19
3.1.5.1 Određivanje sadržaja topivih proteina	19
3.1.5.2 Mjerenje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze	20
3.1.6 Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata	21
3.2. Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa u uvjetima <i>in vivo</i>	22
3.3 Statistička obrada podataka	25
4. Rezultati	27
4.1 Lemna–test	27
4.1.1 Stopa rasta biljaka	27

4.1.2 Prirast broja kolonija	28
4.1.3 Prirast svježe mase biljaka	29
4.1.4 Omjer suhe i svježe mase	30
4.1.5 Površina biljaka	31
4.1.6 Koncentracija topivih proteina	33
4.1.7 Aktivnost gvajakol peroksidaze	33
4.1.8 Koncentracija fotosintetskih pigmenata	34
4.1.8.1 Koncentracija klorofila <i>a</i>	34
4.1.8.2 Koncentracija klorofila <i>b</i>	34
4.1.8.3 Koncentracija karotenoida	35
4.2 Učinkovitost fotosinteze	35
4.2.1 Optimalni prinos fotosustava II	36
4.2.2 Efektivni prinos fotosustava II	37
4.2.3 Stopa prijenosa elektrona – ETR	37
4.2.4 Fotokemijsko gašenje	38
4.2.5 Nefotokemijsko gašenje	39
5. Rasprava	41
5.1 Ovisnost parametara rasta vodene leće o različitim izvorima svjetlosti	41
5.2 Ovisnost koncentracije fotosintetskih pigmenata vodene leće o različitim izvorima rasvjete	43
5.3 Utjecaj različitih izvora svjetlosti na učinkovitost fotosinteze vodene leće	44
6. Zaključak	49
7. Literatura	50
8. Životopis	56

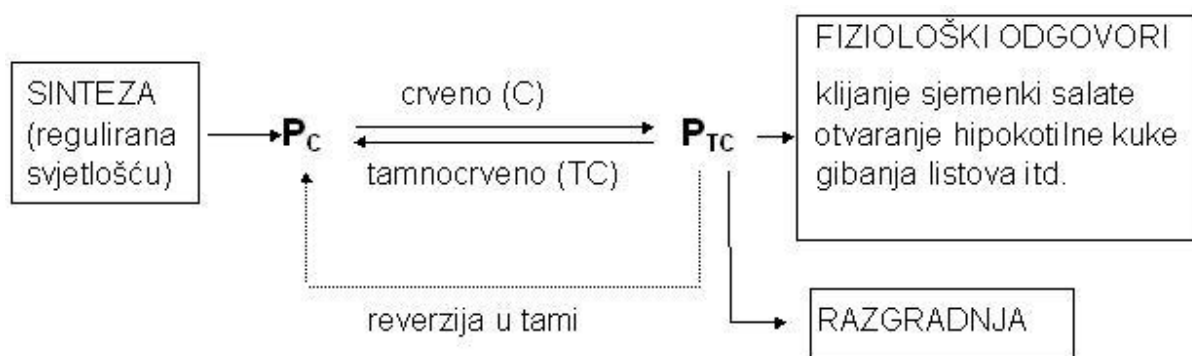
1.1 Djelovanje svjetlosti na rast i razvitak biljaka

Svjetlost je izvor energije o kojem ovise sva živa bića, ali ima i važnu regulatornu ulogu u rastu i razvitku biljaka. Svjetlost kontrolira klijanje sjemenki, razvitak sijanaca i cvjetanje, a odgovor biljaka na svjetlost se ne odnosi isključivo na njezinu prisutnost ili odsutnost već i na promjene u intenzitetu svjetlosti te trajanje osvjetljenja. Sijanci uzgajani u tami pokazuju simptome biljnog bljedila i veoma se razlikuju od onih uzgajanih na svjetlu. Imaju produljene internodije i lisne peteljke, lisne plojke i mehanička te provodna tkiva su rudimentarna, ne otvara se hipokotilna kuka te izostaje sinteza pigmenata. Nakon osvjetljavanja, svojstva se gube, pri čemu svjetlost djeluje kao signal za poticanje ovih promjena. Za potpunu deetiolaciju nužan je razvoj fotosintetskog aparata i odvijanje procesa fotosinteze, no početne promjene inducirane su odgovorom na svjetlost, fotomorfogeneza (Pevalek-Kozlina 2003).

Biljke koje žive u sjeni, pri nižem intenzitetu svjetlosti, više su i imaju veću površinu listova. Te se razlike mogu vidjeti i na substancijskoj razini. Tako se kloroplasti pri niskom intenzitetu svjetlosti svojom najvećom površinom okreću okomito na izvor svjetlosti kako bi je maksimalno iskoristili, a pri visokom intenzitetu svjetlosti paralelno s izvorom svjetlosti i na taj način štite biljku od oštećenja. Fotoperiodizam je specifičan način razvitka biljke koji se javlja kao odgovor na trajanje osvjetljenja. Primjer fotoperiodizma jest i prijelaz iz vegetativne u generativnu fazu, odnosno cvjetanje. U biljka kod kojih cvjetanje jest inducirano duljinom dana razlikujemo biljke kratkog dana koje cvjetaju u uvjetima kratkog dana i biljke dugog dana koje cvjetaju u uvjetima dugog dana. Drugi primjer jest otpadanje lišća listopadnih vrsta i stvaranje dormantnih pupova u jesen u uvjetima kratkog dana (Pevalek-Kozlina 2003).

Svjetlost koja inducira ove promjene stupa u interakciju s fotoreceptorima u biljci, od kojih su najvažniji fitokromi koji apsorbiraju svjetlost crvenog i plavog dijela spektra. Struktura fitokroma otkrivena je istraživanjima koja su provedena na etioliranom biljnom tkivu zobi. Fitokrom je protein koji se sastoji od dugog aminokiselinskog lanca na koji je kovalentnom vezom povezan kromofor koji ima četiri tetrapirolna prstena. Aminokiselinski dio razlikuje se od vrste do vrste, dok je kromofor jednak. Fitokrom može postojati u dva oblika. P_c je oblik koji apsorbira crvenu svjetlost (666 nm), a P_{tc} apsorbira tamnocrvenu svjetlost (730 nm). Ta dva oblika reverzibilno prelaze jedan u drugi. U većini odgovora posredovanih

fitokromom, prelazak u P_{tc} (osvjetljivanje crvenom svjetlosti) inducira odgovor, a prelazak u P_c (osvjetljavanje tamnocrvenom svjetlosti) otkazuje odgovor (Sharrock i Quail 1989).



Slika 1: Proces koji reguliraju pretvorbu fitokroma u stanicama (Preuzeto sa <http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori101.htm>)

Osim na rast i razvitak, svjetlost djeluje i na gibanja biljnih organa i gibanja organela u stanicama. Gibanja u biljaka mogu biti polagana gibanja rasteanjem i podražajna gibanja organa ili organela koja biljci omogućavaju dopiranje do povoljnih ili izbjegavanje nepovoljnih okolišnih uvjeta. Mogu biti reakcija na fizikalne ili kemijske podražaje iz okoliša (inducirana gibanja) ili potaknuta unutrašnjim čimbenicima (endogena gibanja) (Pevalek-Kozlina 2003).

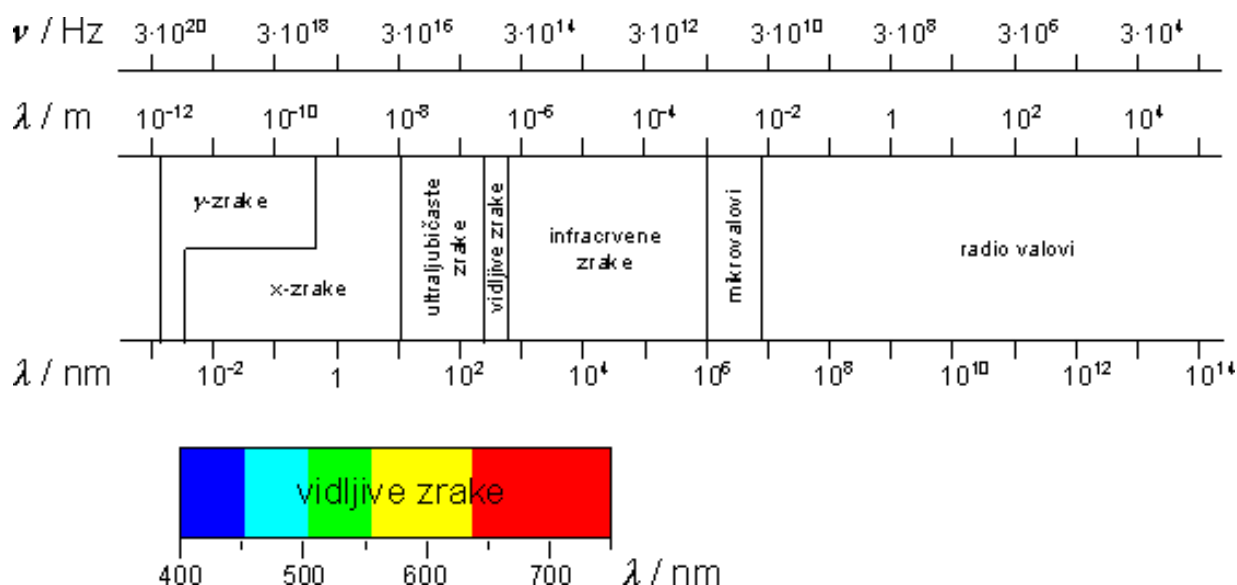
Tropizmi su usmjerena gibanja čvrsto priraslih organizama ili organa potaknuta jednostranim podražajima. Rezultat su različite stope rasta suprotnih strana organa. Fototropizmi su gibanja potaknuta jednostranim osvjetljavanjem koja biljku dovode u povoljniji položaj za iskorištavanje svjetlosti. Osi izdanka, lisne peteljke i koleoptile su pozitivno fototropne i okreću se prema izvoru svjetlosti, a negativno fototropno je korijenje koje se savija u smjeru suprotnom od izvora svjetlosti (Pevalek-Kozlina 2003). Savijanje ka svjetlu regulirano je raspodjelom auksina u vršnom meristemu. Asimetrična raspodjela auksina do koje je došlo u vršku koleoptile uzrokuje jači rast zasjenjene strane (Pevalek-Kozlina 2003).

Nastijska gibanja su gibanja kojima je smjer određen građom organa, a podražaj služi samo kao signal. Najčešće su rezultat promjene turgora. Fotonastije su gibanja potaknuta promjenama intenziteta svjetlosti. Najčešći je primjer reakcija listova ocvjećja na izmjenu dana i noći. Cvjetovi većine vrsta danju su otvoreni, a noću zatvoreni. Listovi stidljive mimoze i kiselice nalaze se u različitim položajima na

svjetlosti i u tami. Na izravnoj svjetlosti listovi su skupljeni kako bi se zaštitili od prejakog intenziteta, a u sjeni listovi su rašireni kako bi apsorbirali što više svjetlosti (Pevalek-Kozlina 2003).

1.2 Svjetlost

Elektromagnetsko zračenje se prema valnim duljinama, odnosno energijama zračenja može podijeliti na gama, rendgensko, ultraljubičasto, vidljivo, infracrveno, mikrovalno zračenje i radiovalove. Svjetlost, osim vidljivog dijela spektra u širem smislu uključuje i infracrveno i ultraljubičasto zračenje. Vidljiva svjetlost sastoji se od dijela spektra elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih duljina od 380 do 780 nm, koje ljudsko oko razlikuje kao boje, od ljubičaste s najmanjom do crvene s najvećom valnom duljinom (Proleksis 2009).



Slika 2: Spektar elektromagnetskog zračenja (Preuzeto sa <http://free-zg.t-com.hr/ivanzub/SAMP/foto1.html>)

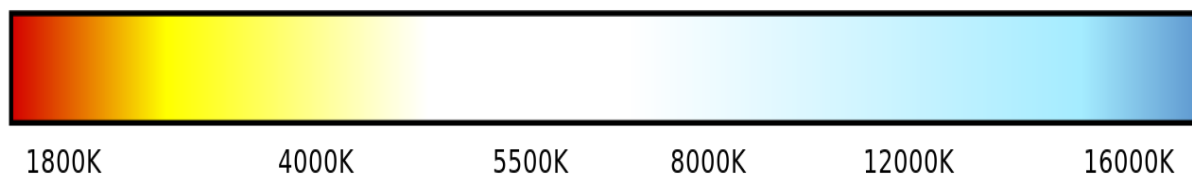
Teorije o prirodi svjetlosti razvijale su se i mijenjale kako su se otkrивale pojave o njezinu širenju. Newton je 1672. pretpostavio da se svjetlost sastoji od roja sitnih čestica (čestična teorija), koje se gibaju određenom brzinom. Kada je Young 1801. otkrio pojavu interferencije svjetlosti, pokazalo se da je tumačenje te pojave moguće samo uz pretpostavku da je svjetlost valne prirode (valna teorija svjetlosti). Tu teoriju

potvrđuje tumačenje i drugih svjetlosnih fenomena kao što su difrakcija i polarizacija. Valna teorija svjetlosti u potpunosti je prihvaćena kada je J. C. Maxwell pokazao da je svjetlost samo dio elektromagnetskog spektra zračenja. A. Einstein 1905. ponovno je postavio teoriju svjetlosti na čestične temelje. Prema Einsteinu, svjetlost je roj čestica, fotona, kojih je energija dana Planckovom relacijom ($E = h\nu$, gdje je h Planckova konstanta, a ν frekvencija). Fotoni su čestice svjetlosti kojima je masa mirovanja nula, a u vakuumu se šire brzinom svjetlosti. Kvantna teorija svjetlosti objašnjava dvojnu prirodu svjetlosti, koja se pokazuje u pojavama interferencije i fotoelektričnog efekta. Prema toj teoriji svjetlost nastaje kvantnim prijelazima elektrona iz jednog energetskega stanja u atomu u drugo. Elektroni su u atomima raspoređeni po stanjima određene energije (kvantna stanja) i dok se nalaze u tim stanjima ne emitiraju energiju. Pri prijelazu elektrona iz kvantnog stanja više energije u kvantno stanje niže energije, razlika u energiji emitira se kao elektromagnetsko zračenje, $E = h\nu$. Vrsta emitiranoga zračenja ovisi o razlici energije početnog i konačnoga stanja. Ako je energetska razlika tolika da se frekvencija zračenja nalazi između 4×10^{14} i 8×10^{14} Hz, emitirana energija ima oblik vidljive svjetlosti (LZMK 1999c).

Svjetlost je jedan od abiotičkih ekoloških čimbenika koji određuje uvjete života na Zemlji. Posebno je važna za biljne organizme zbog procesa fotosinteze. U uvjetima uzgoja *in vitro*, Sunčeva se svjetlost zamjenjuje umjetnim izvorima svjetlosti. Pri izboru umjetne rasvjete obraća se pažnja na to da umjetni izvor svjetlosti bude što sličniji prirodnom izvoru svjetlosti, Suncu (Folta i sur. 2005).

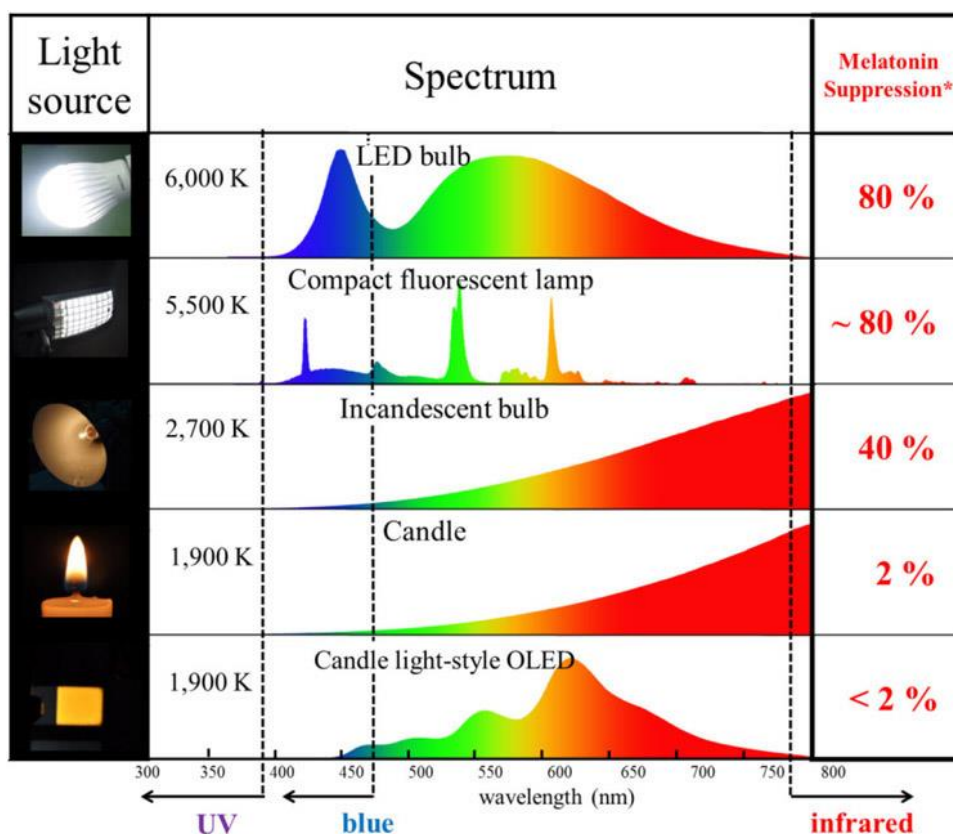
Svako tijelo ima određenu temperaturu o kojoj, prema Wienovom zakonu pomaka ovisi najintenzivnija valna duljina emitiranog zračenja. Poznavanje najintenzivnije valne duljine zračenja svjetla od velike je važnosti u grafičkim, fotografskim, filmskim i izdavačkim djelatnostima. Sunce je najbolji izvor svjetla koje poznajemo. Svjetlo koje ono zrači ima maksimalnu valnu duljinu svjetlosti kao i crno tijelo temperature od oko 5800 K i sjaji najjače u žuto-zelenom dijelu spektra, pri valnoj duljini od 500 nm. Otvoreni plamen emitira zračenje kao i crno tijelo temperature od oko 1500 – 1700 K koje mi doživljavamo kao narančasto-crveno. Kako crna tijela s temperaturama od oko 1700 K najviše zrače u infracrvenom dijelu spektra, mi njihovu boju doživljavamo kao toplu. Razlog tome je što jedan dio infracrvenog spektra mi doživljavamo putem kože kao toplinu. Svjetlo hladnih boja,

bijelo ili plavo, emitiraju crna tijela visoke temperature, iznad 6000 K. Tijela te temperature emitiraju manji dio energije u IC dijelu spektra i doživljavamo ih hladnima.



Slika 3: Maksimalne valne duljine odgovarajućeg zračenja crnog tijela određene temperature (Preuzeto sa <http://www.ekorasvjeta.net/javna-rasvjeta/temperatura-svjetla/>)

Crno tijelo temperature od 4500 do 6000 K emitira zračenje koje oponaša dnevno svjetlo te se iz tog razloga ono koristi u uredima, proizvodnim pogonima, bolnicama, školama. Primjeri svjetiljki koje daju ovakvo svjetlo su fluorescentne i LED žarulje s oznakom „cool white“ tj. bijelom bojom svjetla (Ekorasvjeta.net 2014). Osim „cool white“ oznake postoje i žarulje s „warm light“ i „warm comfort light“ oznakama koje emitiraju veći dio zračenja u dijelu spektra pomaknutom prema infracrvenom području.



Slika 4: Emisijski spektri umjetnih rasvjetnih tijela s temperaturama svjetla
(Prerađeno prema <https://www.seeko.co.kr/zboard4/zboard.php?id=freeboard&no=785195>)

Pri izboru umjetne rasvjete osim na maksimalnu valnu duljinu zračenja važno je obratiti pažnju i na CRI indeks (Color Rendering Index). CRI indeks pokazuje u kolikoj mjeri izvor svjetlosti oponaša savršeni izvor svjetlosti, Sunce. Što je indeks viši, to je spektar kojeg emitira umjetni izvor svjetlosti sličniji spektru kojeg emitira Sunce.

Treći parametar kojim opisujemo umjetni izvor svjetlosti je intenzitet osvjetljenja. To je mjera koja kazuje koliko fotona svjetlosti (u μmol) obasjava jedinicu površine u određenom vremenskom periodu. Intenzitet osvjetljenja mjeri se luksmetrom, SI jedinica za intenzitet osvjetljenja je lux, [lx], a izvedena jedinica je $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sunčevom svjetlu odgovara intenzitet osvjetljenja od $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Apogee 2007). Intenzitet umjetne rasvjete može varirati. Niskim intenzitetom osvjetljenja smatra se intenzitet do $\sim 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, srednjim intenzitetom od 50 do $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ te visokim od 300 do $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Artexe i sur. 2002).

Do sada su se u uvjetima uzgoja *in vitro* najčešće upotrebljavale fluorescentne žarulje, no u novije vrijeme uvodi se i LED rasvjeta (Singh i sur. 2014). Ove dvije vrste rasvjete razlikuju se u valnim duljinama emitirane svjetlosti zbog načina na koji se svjetlost dobiva. Kod fluorescentne rasvjete, svjetlost se dobiva fluorescencijom fluorescentnog sloja na unutrašnjoj strani stakla žarulja potaknuto UV-zračenjem koje nastaje ionizacijom i električnim izbijanjem živinih para koje se nalaze u cijevi žarulje (Schwarz i sur. 2009, LZMK 1999a). S druge strane, LED žarulje su diode, odnosno spoj dva tipa poluvodiča, n-tipa i p-tipa. Svjetlost se kod LED žarulja dobiva pretvaranjem električnog signala u optički. Prilikom rekombinacije nosioca električnog naboja, elektroni prelazeći iz vodljivog u valentni pojas oslobađaju energiju dijelom kao toplinu, a dijelom kao zračenje (LZMK 1999d).

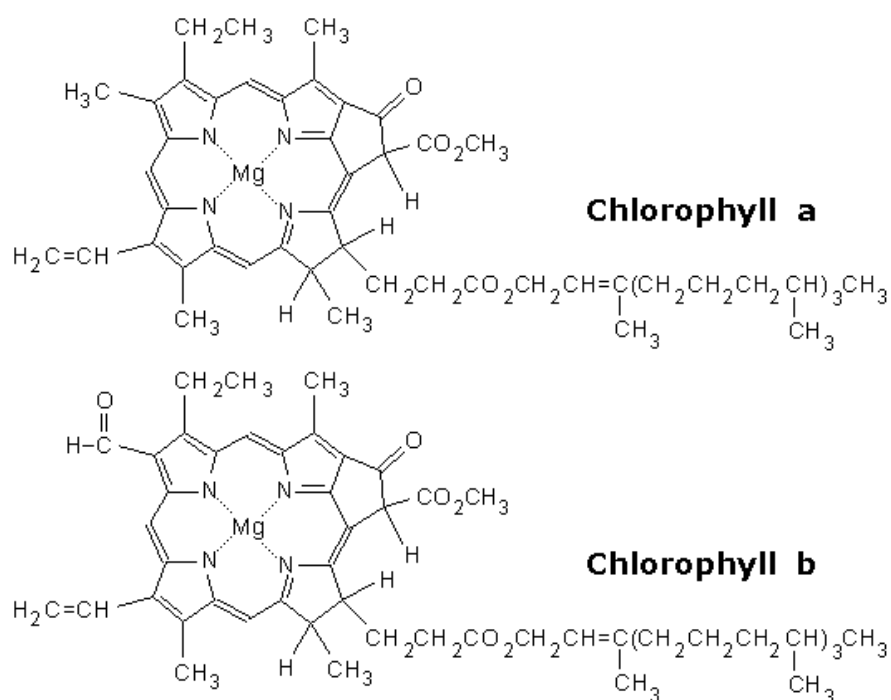
1.3 Fotosinteza

Fotosinteza je proces u kojem se energija Sunčeva zračenja prevodi u kemijsku energiju pohranjenu u kemijskim vezama ugljikohidrata nizom reakcija kataliziranih enzimima. Energija pohranjena u molekulama ugljikohidrata koristi se za procese rasta i razvoja biljaka, ali i kao izvor energije za sve žive organizme. Mezofil lista najaktivnije je fotosintetsko tkivo biljaka, iako svi zeleni dijelovi biljke vrše proces fotosinteze.

Fotosintezu možemo podijeliti na primarne ili svjetlosne reakcije te sekundarne reakcije ili reakcije Calvinova ciklusa. U primarnim reakcijama odvija se fotoliza vode, uz oslobađanje kisika kako bi se nadomjestili elektroni koji su korištenjem energije Sunčeva zračenja izbačeni s molekule klorofila *a* u reakcijskom središtu. U sekundarnim reakcijama se ugljikov(IV) oksid reducira do ugljikohidrata. Svjetlosne reakcije fotosinteze odvijaju se na tilakoidnim membranama kloroplasta, u kojima se nalaze molekule klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoidi (Pevalek–Kozlina 2003).

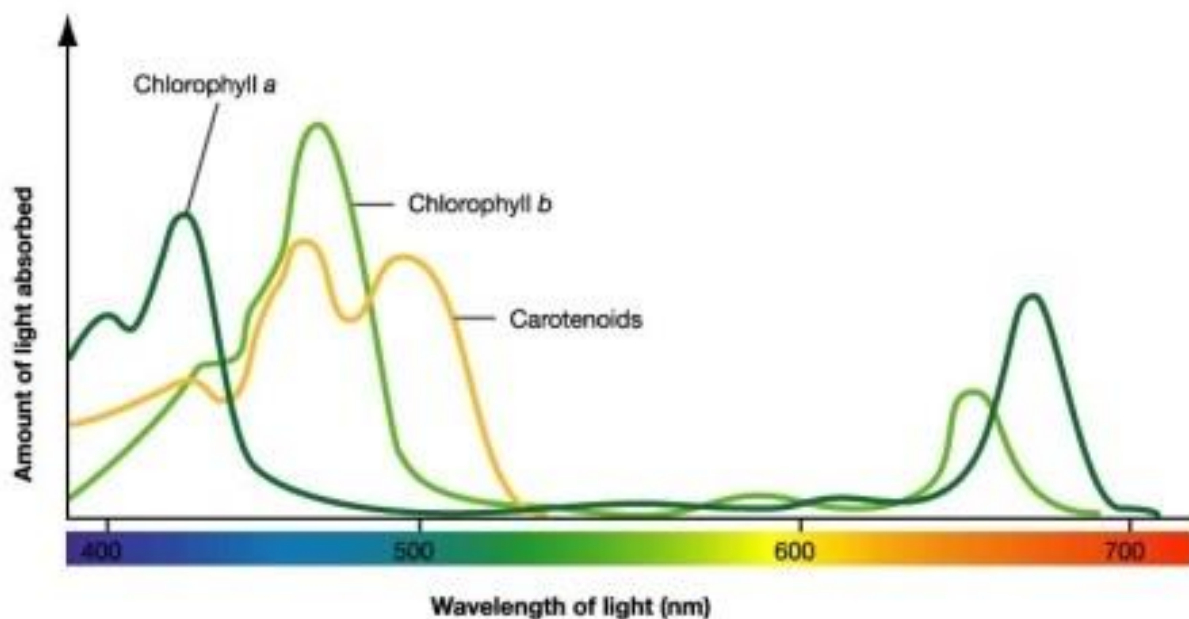
Fotosintetski pigmenti apsorbiraju crveni i plavi dio spektra vidljivog zračenja, a središnji, zeleni dio reflektiraju. Svjetlosno zračenje mogu apsorbirati klorofil *a* (maksimumi apsorpcije nalaze se pri 430 i 662 nm), zatim klorofil *b* (maksimumi apsorpcije nalaze se pri 453 i 642 nm) te karotenoidi (maksimumi apsorpcije nalaze se između 380 i 550 nm). Udio klorofila *b* može doseći 1/3 udjela klorofila *a* u biljci. Molekule pigmenata čine fotosustave, klorofil *a* smješten je u reakcijskom središtu,

središnjem dijelu fotosustava, dok su klorofil *b* i karotenoidi smješteni okolo i čine antenske molekule koje hvataju svjetlost i prenose ju do reakcijskog središta. Energija svjetlosti se koristi za fotolizu vode, a elektroni nastali fotolizom prenose se koenzimom NADP⁺ do molekula ugljikovodika.



Slika 7: Strukturni prikaz molekule klorofila *a* i klorofila *b* (Preuzeto sa <http://www.food-info.net/uk/colour/chlorophyll.htm>)

Iako i klorofil *b* i karotenoidi mogu apsorbirati Sunčevo zračenje, samo molekule klorofila *a* se nalaze u reakcijskom središtu fotosistema i mogu biti oksidirane, tj. predati elektron akceptoru elektrona u lancu prijenosa elektrona. No, djelotvoran spektar fotosinteze ne poklapa se u potpunosti s spektrom klorofila *a*, jer se i zračenje koje su apsorbirali klorofil *b* i karotenoidi prenosi na klorofil *a* i na taj način koristi u svjetlosnim reakcijama fotosinteze. Mogućnost prijenosa energija od drugih pigmenata na klorofil *a* biljke koriste za sužavanje tzv. „zelene rupe“ u apsorpciji klorofila (Pevalek–Kozlina 2003) i na taj način maksimalno iskorištavajući vidljivi dio spektra Sunčeva zračenja.



Slika 8: Apsorpcijski spektri klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida (Preuzeto sa <http://www.elegancereef.com/proizvodi/led-rasvijeta/212-maxspect-r420r-led-rasvijeta>)

Za biljke nije pogodan ni visok ni nizak intenzitet svjetlosti. Svjetlosni stres može biti uzrokovan prejakim intenzitetom osvjetljenja koji najviše i najprije djeluje na proces fotosinteze. U biljkama koje nisu prilagođene na visoki intenzitet svjetlosti dolazi do smanjivanja stope fotosinteze, a kod osjetljivih biljaka (biljke sjene ili biljke sunca koje su naglo izložene izrazito visokim intenzitetima svjetla) može doći do fotoinhibicije ili čak ugibanja listova. Fotoinhibicija se također javlja zbog prezasićenja fotosintetskog aparata što može dovesti do stvaranja fototoksičnih produkata (reaktivnih oblika kisika – singletnog kisika, superoksidnog aniona i hidroksilnog radikala) koji nespecifično reagiraju s gradivnim molekulama stanice uzrokujući njihovu fotooksidacijsku razgradnju. U zaštiti biljaka od svjetlosnog stresa veliku ulogu imaju karotenoidi koji preuzimaju višak energije od molekula klorofila *a* te dodatna zaštita koju pruža gibanje listova i kloroplasta od direktnog izvor osvjetljenja

(Pevalek–Kozlina 2003). Višak energije koji apsorbiraju pigmenti može oštetiti fotosintetske membrane ukoliko se ta energija ne iskoristi u fotosintezi. Ako elektroni iz molekule klorofila dugo ostanu u pobuđenom stanju, dolazi do reakcije s molekulom kisika i nastaje singletni kisik koji je vrlo reaktivan i može oštetiti mnoge stanične sastojke, osobito lipide stanične membrane i membrana organela. Karotenoidi djeluju zaštitno tako da brzo „ugase“ pobuđeno stanje klorofila preuzimajući dio energije na sebe. Pobuđeno stanje karotenoida nema dovoljno energije za nastanak singletnog kisika te se vraća u osnovno stanje, otpuštajući višak energije u obliku topline (Pevalek-Kozlina 2003). Zbog ovih se svojstava koncentracija karotenoida može smatrati indikatorom nepovoljnih uvjeta u okolišu.

Mjerenjem fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa *in vivo* može se odrediti učinkovitost fotosinteze. Svjetlost emitirana fluorescencijom predstavlja vrlo mali udio u svjetlosti reflektiranoj s listova biljaka pa se može detektirati samo preciznim uređajima - fluorimetrima. U posljednjem desetljeću su mjerenja i analize fluorescencije klorofila postali nezaobilazni u istraživanjima primarnih reakcija fotosinteze. Listovi biljaka prilagođenih na uvjete tame obasjavaju se crvenom svjetlosti niskog intenziteta, zatim kratkotrajnim pulsom svjetlosti visokog intenziteta te na kraju opetovanim pulsovima aktiničnog bijelog svjetla. Iz podataka dobivenih mjerenjima izračunaju se optimalni i efektivni prinos fotosistema II, stopa prijenosa elektrona, fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje. Usporedbom tih podataka s uobičajenim vrijednostima procjenjuje se učinak ispitivanih tretmana na biljku i definiraju se nepovoljni uvjeti.

1.4 Lemna–test

1.4.1 Vodena leća (*Lemna minor* L.)

Vodena leća, *Lemna minor* L., malena je jednosupnica jednostavne građe koja se ubraja u porodicu *Lemnaceae*. Osim roda *Lemna*, u toj su porodici i biljke rodova *Spirodela*, *Wolffia* i *Wolffiella*.

Tijelo biljke vodene leće nalikuje duguljastim listićima duljine do 1 cm. Proksimalni, uži dio, odgovara reduciranoj osi izdanka, dok distalni, širi dio odgovara listu. Vodena leća razvija korjenčiće (svaka biljka samo jedan) duljine do 5 cm, no oni

nemaju ulogu apsorpcije vode i hranjivih tvari nego održavaju biljke u uspravnom položaju budući da je vodena leća slobodno plutajuća vrsta. Vodu i hranjive tvari vodena leća umjesto korijenom apsorbira cijelom površinom biljke.



Slika 9: Vodena leća, *Lemna minor* L.

Osim zbog jednostavne građe, vodena leća rado se koristi u istraživanjima zbog brzog vegetativnog razmnožavanja i visoke osjetljivosti na promjenu okolišnih uvjeta i prisutnost onečišćivača (Vidaković–Cifrek 1999, Radić i sur. 2009). Vegetativno razmnožavanje osigurava genetičku istovjetnost. Na proksimalnom dijelu biljke sa svake strane nalazi se reproduktivni džep u kojem se nalazi meristemsko tkivo. U tim tvorbama započinje vegetativno razmnožavanje pupanjem ili se pak u njima razvija cvijet. Novonastale biljke se jedno vrijeme drže povezane stolonima uz majčinsku biljku no nakon nekog vremena one se odvajaju.

Vodena leća, dakle, posjeduje brojna svojstva koja ju čine pogodnom vrstom za istraživanja u laboratorijskim uvjetima: 1) biljke su malih dimenzija no dovoljno velike kako bi se promjene uzrokovane istraživanjem mogle vidjeti golim okom, 2) jednostavne su građe, 3) zbog malih dimenzija ne zahtijevaju puno prostora prilikom uzgoja ili izvođenja pokusa, 4) hranidbena podloga je jednostavna i jeftina, 5) brzo se

razmnožavaju, 6) vegetativno razmnožavanje osigurava genetičku istovjetnost, 7) vodena leća osjetljiva je na nazočnost različitih tvari u hranidbenoj podlozi (Vidaković-Cifrek 1999).

1.4.2 Izvođenje Lemna–testa

Okolišni čimbenici koji nisu optimalni za razvoj biljaka kao i prisustvo nekih tvari u okolišu mogu imati nepovoljan utjecaj na biljke. Lemna–test biljni je biotest koji se koristi u biljnoj fiziologiji kako bi se procijenila biološka aktivnost različitih tvari te u toksikologiji kako bi se procijenila toksičnost kemikalija (Hillman 1961, Landolt 1986, citirano u Vidaković–Cifrek 1999). Biljke iz porodice *Lemnaceae* izlažu se ispitivanoj tvari, dodatkom u hranidbenu podlogu na kojoj se biljke uzgajaju. Vodene leće su plutajuće biljke te su stoga izuzetno pogodne za ispitivanje i procjenu onečišćenja prirodnih voda (Wang 1986, citirano u Vidaković–Cifrek 1999).

Učinak istraživane tvari ili fizikalnih čimbenika u Lemna–testu određuje se praćenjem preživljavanja biljaka, prirasta biljaka, duljine korjenčića, koncentracije fotosintetskih pigmenata, intenziteta disanja, fotosintetske aktivnosti i ultrastrukturnih promjena (Hilman 1961, Smith i Kwan 1989, Wang 1990, Severi 1991, citirano u Vidaković–Cifrek 1999). Osim toga, Lemna–testom mogu se pratiti i biokemijski pokazatelji toksičnosti, promjena količine proteina i aktivnost enzima.

U većini slučajeva učinak se izražava u odnosu na preživljavanje biljaka, rast, odnosno akumulaciju biomase ili kao stopa asimilacije ugljikova (IV) oksida i mineralnih tvari (Pevalek–Kozlina 2003). Biljke često pokazuju djelomičnu otpornost na nepovoljne uvjete, a mogu se i aklimatizirati na njih opetovanim izlaganjem njihovom djelovanju. Na nepovoljne okolišne čimbenike biljke pokazuju odgovor u različitom vremenskom periodu. Npr. promjena temperature će postati stresna u roku od nekoliko minuta, a nedostatak minerala u tlu pokazat će se stresnim tek kroz nekoliko mjeseci. Veoma brzo nakon naglih promjena okolišnih čimbenika, odnosno nastupanja nepovoljnih uvjeta, biljke sintetiziraju molekule, najčešće proteine koje će ih zaštititi od oštećenja.

Prvo su otkriveni proteini koji se sintetiziraju uslijed izlaganja biljke visokim temperaturama – proteini toplotnog stresa („heat shock proteins“), a kasnije je

otkriveno da postoji i odgovor biljaka na druge promjene u okolišu (Welch 1993, Vierling 1997, citirano u Vidaković–Cifrek 1999). Udio tih proteina uslijed i neposredno nakon stresa može značajno porasti, a nakon prestanka djelovanja stresora njihov udio se smanjuje (Waters i sur. 1996, citirano u Vidaković–Cifrek 1999) što znači da imaju važnu ulogu u oporavku biljaka od stresa.

U toksikološkim testovima često se koristi promjena aktivnosti enzima kao pokazatelj nazočnosti onečišćivača u okolišu. Biljne peroksidaze koriste se kao enzimi-biljezi pri proučavanju fizioloških procesa i djelovanja različitih tvari na biljke zbog toga što sudjeluju u brojnim procesima u stanici (Vidaković-Cifrek 1999). Također, promjena aktivnosti enzima ili njegovo oslobađanje u izvanstanične prostore može biti odgovor na različite stresne uvjete (suša, hipoksija, povišena ili snižena temperatura, osmotski šok, onečišćenje tla ili zraka) (Keller 1974, Siegel i Siegel 1986, Repka i Vanek 1993, Zhang i Kirkham 1994, Weckx i Clijsters 1997, citirano u Vidaković-Cifrek 1999).

Peroksidaze su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije u kojima vodikov peroksid (H_2O_2) služi kao akceptor elektrona pri oksidaciji organskog supstrata. One su sveprisutni enzimi, pronađeni u biljkama, životinjama, gljivama ali i prokariotskim organizmima (LZMK 1999b). Po kemijskom sastavu su glikoproteini koji imaju molekulsku masu u rasponu od 32 kDa do 45 kDa. U biljnoj stanici se nalaze u vakuoli, staničnoj stijenci, Golgijevom tijelu, endoplazmatskom retikulumu, mitohondrijima, ali i u izvanstaničnom prostoru (Gaspar i sur. 1982, citirano u Vidaković-Cifrek 1999) i kataliziraju procese vezane uz rast i diferencijaciju stanica (Gaspar i sur. 1982, Gaspar i sur. 1991, citirano u Vidaković-Cifrek 1999), biosintezu lignina povezivanjem polimera (Catesson i sur. 1986, citirano u Vidaković-Cifrek 1999) i polimerizaciju fenolnih monomera u biosintezi suberina, zaštiti stanice od oksidativnog djelovanja peroksidnog radikala (Van Assche i Clijsters 1990, citirano u Vidaković-Cifrek 1999) te u katabolizmu auksina kontrolirajući njegovu količinu (Grambow 1986, Gaspar i sur. 1991, citirano u Vidaković-Cifrek 1999).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi postoji li razlika u rastu i fotosintezi biljaka koje su uzgajane pri različitim izvorima svjetlosti. Biljke su uzgajane na dvije različite hranidbene podloge pri dva različita izvora svjetlosti, fluorescentnoj i LED rasvjeti. Fluorescentna rasvjeta se već dugi niz godina koristi u staklenicima, a LED rasvjeta se u sve većem obimu koristi zadnjih desetak godina. U ovom radu praćen je rast biljaka (prirast broja biljaka i broja kolonija, prirast mase, ukupna površina biljaka) i nekoliko fizioloških pokazatelja (koncentracija fotosintetskih pigmenata, ukupna količina topivih proteina, aktivnost enzima gvajakol peroksidaze te fotosintetska učinkovitost). Na temelju dobivenih rezultata sam usporedila učinak dvaju različitih izvora svjetlosti na vodenu leću.

3. Materijali i metode

3.1 Lemna-test

Vodena leća koju sam koristila u ovom istraživanju sakupljena je u Botaničkom vrtu Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom uvođenja vodene leće u kulturu *in vitro* 1995. godine biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom postupkom po Krajnciću i Devidéu (1980) i dalje uzgajane u sterilnim uvjetima u klima-komori.

Za dugotrajnu kultivaciju vodene leće koristi se modificirana hranjiva podloga po Pirsonu i Seidelu (Pirson i Seidel 1950), a za istraživanja hranjiva podloga po Steinbergu (1946). Sastav modificirane hranjive podloge po Pirsonu i Seidelu (PS) prikazuje Tablica 1, a Steinbergovu podlogu (S) Tablica 2. pH vrijednost podloge PS podešena je na 4,55 a podloge S na 5,5 otopinom kalijevog hidroksida koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

Tablica 1: Sastav modificirane hranjive podloge po Pirsonu i Seidelu

MAKROELEMENTI	mg dm⁻³
KNO ₃	400
KH ₂ PO ₄	200
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	300
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	804
MIKROELEMENTI	mg dm⁻³
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,3
H ₃ BO ₃	0,5
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	18,6
Željezni citrat	5,0
ORGANSKI DODACI	g dm⁻³
Saharoza	10,0
Asparagin	0,1
pH vrijednost: 4,55	

Tablica 2: Sastav hranjive podloge po Steinbergu

MAKROELEMENTI	mg dm⁻³
KNO ₃	350
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	295
KH ₂ PO ₄	90
K ₂ HPO ₄	12,6
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	100
MIKROELEMENTI	mg dm⁻³
H ₃ BO ₃	120
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	180
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	44
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	180
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	760
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	1500
pH vrijednost: 5,5	

U standardiziranom Lemna–testu (ISO/CD 20079) prati se rast biljaka na podlozi S. U ovom istraživanju pratila sam rast biljaka i na S i na PS podlozi. Biljke su bile izložene dvjema vrstama rasvjete, fluorescentnoj i LED, istog intenziteta svjetlosti.

Tikvice s hranjivim podlogama (60 mL i 150 mL) začepila sam vatom i aluminijskom folijom te sterilizirala autoklaviranjem na temperaturi od 121 °C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 20 minuta.

U tikvice sa hranjivim podlogama nasađivala sam vodenu leću. U tikvice sa 60 mL hranjivih podloga nasađivala sam ukupno tri do četiri biljke u jednoj do dvije kolonije. Priredila sam osam replika po tretmanu, ukupno 32 replike. Te sam biljke

koristila za određivanje parametara rasta u Lemna-testu te za određivanje učinkovitosti fotosinteze. Za određivanje ukupne površine biljaka imala sam 4 replike po tretmanu, ukupno 16 replika. U tikvice sa 150 mL hranjive podloge nasađivala sam ukupno desetak biljaka u tri do četiri kolonije. Te sam biljke koristila za određivanje koncentracije topivih proteina i aktivnosti enzima te koncentracije pigmenata. Za taj pokus sam pripremila 8 replika po tretmanu, ukupno 32 replike. Biljke su prije nasađivanja na hranidbenu podlogu po Steinbergu, aklimatizirane na podlozi po Steinbergu u trajanju od dva tjedna.

Biljke su rasle u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame), na temperaturi 24 ± 1 °C uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki ($PPFD = \sim 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i bijelih LED svjetiljki ($PPFD = \sim 50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u klima – komori. Biljke su uzgajane u dvije supkulture. Nakon sedam dana trajanja pokusa, biljke su bile presađene u nove tikvice sa hranjivim podlogama te je uzgoj nastavljen do četrnaestog dana. Proveden je statički Lemna-test što znači da nisu dodavane nikakve druge tvari tijekom trajanja prve i druge supkulture.

3.1.1 Određivanje stope rasta biljaka

Prirast broja biljaka određivala sam brojanjem biljaka tjedan dana, na dane 0, 3, 4, 5, 6 i 7 u obje supkulture. Pri tome je brojana svaka pa i najmanja biljka vidljiva golim okom. Stopu rasta izračunala sam prema ISO standardu (ISO/CD 20079) Lemna-test:

$$GR_n = \frac{\ln(N_n) - \ln(N_0)}{n}$$

N_0 – broj biljaka nultog dana

N_n – broj biljaka n -tog dana

$n = 0, 3, 4, 5, 6, 7$ dana

Svaki tretman (biljke uzgajane na podlozi S izložene fluorescentnom i LED svjetlu te na podlozi PS izložene fluorescentnom i LED svjetlu) pripremljen je u osam replika. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost prirasta broja biljaka po danu \pm standardna pogreška.

3.1.2 Određivanje prirasta broja kolonija

Prirast broja kolonija određivala sam brojanjem kolonija tijekom tjedan dana, na dane 0, 3, 4, 5, 6 i 7 u dvije supkulture. Broj kolonija umanjila sam za broj kolonija nultog dana te također izračunala prirast broja kolonija prema ISO standardu (ISO/CD 20079) Lemna-test:

$$GR_n = \frac{\ln(N_n) - \ln(N_0)}{n}$$

N_0 – broj kolonija nultog dana

N_n – broj kolonija n -tog dana

$n = 0, 3, 4, 5, 6, 7$ dana

Svaki tretman (biljke uzgajane na podlozi S izložene fluorescentnom i LED svjetlu te na podlozi PS izložene fluorescentnom i LED svjetlu) pripremljen je u osam replika. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost prirasta broja biljaka po danu \pm standardna pogreška.

3.1.3 Određivanje prirasta mase biljaka

Biljke sam vagala nultog i sedmog dana pokusa u obje supkulture. Nakon vaganja sedmog dana, biljke sam posušila u sušioniku na 105 °C, kako bih odredila suhu masu biljaka. Iz tih podataka izračunala sam prirast svježe mase i omjer suhe i svježe mase zadnjeg dana pokusa prema ISO standardu (ISO/CD 20079) Lemna-test:

$$\text{Prirast svježe mase} = \frac{\ln(FW') - \ln(FW)}{7}$$

$$\text{Omjer suhe i svježe mase} = \frac{DW}{FW'}$$

DW – suha masa

FW' – svježa masa zadnjeg dana pokusa

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

3.1.4 Određivanje površine biljaka

Ukupnu površinu biljaka određivala sam sedmi i četrnaesti dan pokusa. Biljkama sam odstranila korjenčiće, postavila ih na bijeli papir i snimila zajedno s papirićem plave boje poznate površine. Površinu biljaka odredila sam pomoću programa ImageJ, Image Processing and Analysis in Java (Glozer 2008). Osim kao ukupnu površinu biljaka, ovaj pokazatelj sam izrazila i kao površinu po broju biljaka zadnjeg dana pokusa.

Svaku repliku snimila sam dva puta, te površinu izrazila kao srednju vrijednost \pm standardna pogreška.

3.1.5 Ekstrakcija i određivanje sadržaja topivih proteina i mjerenje aktivnosti enzima

Nakon sedmog i četrnaestog dana pokusa, uzorke vodene leće (po ~100 mg) homogenizirala sam u 1,2 ml pufera kalijeva fosfata (pH 7,0, $c = 50 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) uz dodatak EDTA ($c = 0,1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i oko 50 mg netopivog polivinilpolipirolidona te zatim centrifugirala 30 minuta pri 25000 g i temperaturi od +4 °C u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18). Dio dobivenog supernatanta iskoristila sam za određivanje koncentracije proteina metodom Bradforda (1976), a drugi dio za određivanje aktivnosti enzima.

3.1.5.1 Određivanje sadržaja topivih proteina

Bradfordova metoda temelji se na mjerenju apsorbanije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa pri valnoj duljini 595 nm. Koncentraciju proteina u pojedinim

uzorcima odredila sam izračunavanjem na temelju baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog albumina iz goveda poznatih koncentracija (u rasponu od 0,1 do 0,8 mg/mL).

U 1 ml radne otopine po Bradfordu dodala sam 50 μ l uzorka sirovog proteinskog ekstrakta. Radna otopina po Bradfordu priprema se iz matične Bradford otopine (Tablica 3). Uzorci su mućkani na mućkalici i inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi prije spektrofotometrijskog mjerenja.

Koncentraciju proteina izrazila sam kao omjer mase proteina i svježe mase tkiva (mg proteina po gramu svježe mase biljnog tkiva).

Tablica 3: Sastav matične i radne otopine po Bradfordu

MATIČNA OTOPINA	RADNA OTOPINA
100 ml etanola ($w = 0,96$)	15 mL etanola ($w = 0,96$)
200 ml H_3PO_4 ($w = 0,88$)	30 ml H_3PO_4 ($w = 0,88$)
350 mg Coomassie brilliant blue G 250	30 ml Bradford matične otopine
450 ml H_2O	

3.1.5.2 Mjerenje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze

Aktivnost gvajakol peroksidaze odredila sam spektrofotometrijski. Reakcijska smjesa je sadržavala 50 mmol dm^{-3} pufera kalijeva fosfata (K_2HPO_4 / KH_2PO_4), pH vrijednosti 7, 18 mmol dm^{-3} gvajakola ($C_7H_8O_2$) i 5 mmol dm^{-3} vodikova peroksida (H_2O_2). Na 950 μ L reakcijske smjese dodala sam 50 μ L proteinskog ekstrakta i mjerila porast apsorbancije svakih 10 sekundi tijekom 100 sekundi pri valnoj duljini od 470 nm.

Aktivnost gvajakol peroksidaze izrazila sam kao količinu nastalog tetragvajakola i izrazila u μmol po minuti po gramu svježeg tkiva ($\text{U g}^{-1} \text{ sv.t.}$).

$$\text{aktivnost} = \frac{\Delta A_{470} \times f \times V_{rs}}{V_{uz} \times m \times \varepsilon \times l}$$

ΔA = srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 sekundi

f = faktor kojim se množi da bi se rezultat mogao izraziti po minuti (6)

V_{rs} = ukupan volumen reakcijske smjese

V_{uz} = volumen dodanog uzorka

ε = molarni apsorpcijski koeficijent tetragvajakola ($26,6 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l = dužina optičkog puta (1 cm)

3.1.6 Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata

Uzorke svježeg tkiva mase 30 mg ekstrahirala sam u 1,5 ml hladnog acetona ($w = 0,8$) u tarioniku kojeg sam držala na ledu. Svaki sam uzorak, centrifugirala deset minuta pri 5000 g, i supernatant prenijela u staklene kivete. Sve uzorke sam nadopunila do volumena od 1,5 ml. Sadržaj pigmenata odredila sam spektrofotometrijski koristeći UV / VIS spektrofotometar Specord (Analytik Jena, Njemačka). Mjerena je apsorbancija na tri valne duljine: 663, 646 i 470 nm za svaki uzorak. Rezultati su izraženi kao mikrogram pigmenta po mililitru reakcijske smjese ($\mu\text{g} / \text{mL}$).

Koncentraciju fotosintetskih pigmenata izračunala sam prema slijedećim jednadžbama:

1. Koncentracija klorofila *a*

$$c_{chla} = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}$$

2. . Koncentracija klorofila *b*

$$c_{chlb} = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}$$

3. Koncentracija karotenoida

$$C_{car} = \frac{1000 \times A_{470} \times c_{chl\ a} - 104 \times c_{chl\ b}}{198}$$

$c_{chl\ a}$ = koncentracija klorofila *a*

$c_{chl\ b}$ = koncentracija klorofil *b*

c_{car} = koncentracija karotenoida

A_{646} = apsorbancija pri 646 nm

A_{663} = apsorbancija pri 663 nm

A_{470} = apsorbancija pri 470 nm

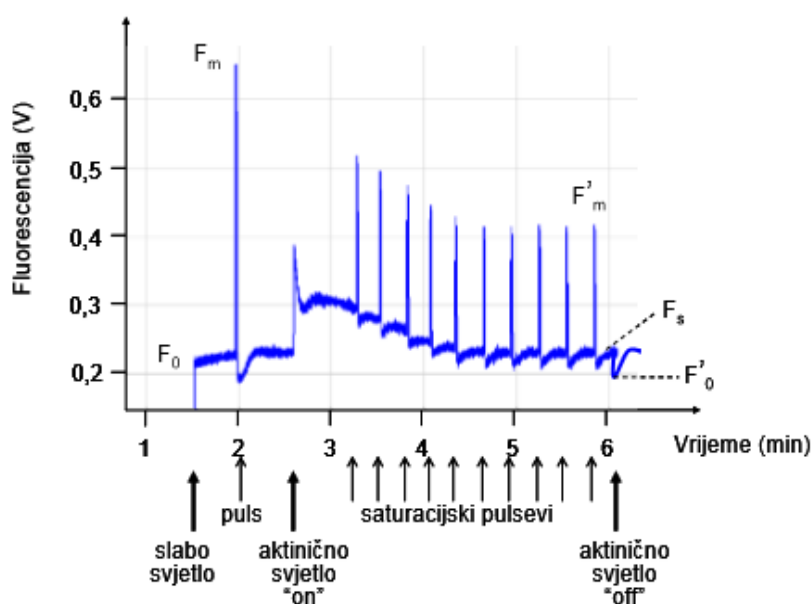
3.2. Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa u uvjetima *in vivo*

Fluorescenciju klorofila *a* u uvjetima *in vivo* mjerila sam sedmi i četrnaesti dan pokusa metodom saturacijskog pulsa po Maxwellu (2000) pomoću Qubit sustava za mjerenje fluorescencije (Kanada). Za bilježenje i obradu podataka sam koristila program Logger Pro. Ukupno sam imala 4 replike po tretmanu (ukupno 32 replike).

Biljke sam prije mjerenja stavila u tamu na 30 minuta. Desetak biljaka prilagođenih uvjetima tame postavila sam na držač uzorka na navlaženi filter papir te obasjala crvenom svjetlošću niskog intenziteta ($PFD \approx 1\text{--}3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) koja je nedovoljna za pokretanje fotokemijskih reakcija. U ovakvim sam uvjetima mjerila minimalnu razinu fluorescencije klorofila (F_0). Zatim sam primijenila jednokratni saturacijski puls, odnosno kratkotrajnu svjetlost visokog intenziteta ($\approx 3600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) koja uzrokuje redukciju svih reakcijskih centara fotosistema II i dovodi do pojave maksimalne vrijednosti fluorescencije (F_m).

Nakon toga sam uključila kontinuiranu bijelu svjetlost (aktiničnu svjetlost) čiji je intenzitet dovoljno visok za pokretanje fotosinteze ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Kad se signal fluorescencije ustalio, uključila sam automatsku kontrolu saturacijskih pulseva ($PFD \approx 3600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\nu \approx 40 \text{s}^{-1}$) pri čemu se bilježe vrijednosti maksimalne fluorescencije. Ponavljajuća primjena saturacijskih pulseva prouzročila je pad maksimalne razine fluorescencije (F'_m).

Vrijednosti maksimalne fluorescencije (F'_m) i fluorescencije ravnotežnog stanja (F_s) očitala sam pri kraju mjerenja, kada se maksimalna vrijednost fluorescencije (F'_m) ustalila. Na samom kraju mjerenja, ugasila sam aktinično bijelo osvjetljenje pri čemu je biljka ostala osvjetljena samo crvenim svjetlom niskog intenziteta. U takvim uvjetima očitala sam minimalnu razinu fluorescencije u listu prilagođene uvjetima svjetla (F_0'). Iz podataka dobivenih mjerenjima izračunala sam pokazatelje učinkovitosti fotosistema II.



Slika 10: Mjerenje učinkovitosti fotosinteze metodom saturacijskog pulsa u uvjetima *in vivo* (Preuzeto iz Vidaković-Cifrek i sur. 2014)

1. Optimalni prinos fotosistema II (maksimalna učinkovitost fotosistema II)

$$\frac{(F_m - F_0)}{F_0} = \frac{F_v}{F_m}$$

F_v = varijabilna fluorescencija

F_m = maksimalna fluorescencija u biljci prilagođenoj na uvjete tame

F_0 = minimalna fluorescencija

F_v , ili varijabilna fluorescencija označava razliku između maksimalne i minimalne fluorescencije. Omjer varijabilne fluorescencije i maksimalne fluorescencije u listu prilagođenom na uvjete tame mjera je optimalnog prinosa fotosistema II, odnosno njegove učinkovitosti u uvjetima kada su svi reakcijski centri oksidirani. Za većinu vrsta ona iznosi $\sim 0,7$.

2. Efektivni prinos fotosistema II (ϕ_{PSII})

$$\phi_{PSII} = \frac{(F'_m - F_s)}{F'_m}$$

ϕ_{PSII} = efektivna učinkovitost fotosistema II

F'_m = maksimalna fluorescencija u biljci prilagođenoj na uvjete svjetla

F_s = fluorescencija ravnotežnog stanja

Fluorescencija ravnotežnog stanja, F_s , je prinos fluorescencije lista prilagođenog određenoj količini svjetlosti, a maksimalna fluorescencija u uvjetima osvjetljenja, F'_m , se mjeri nakon primjene saturacijskog pulsa u listu prilagođenom na uvjete svjetla. Iz ova dva se podatka računa efektivna učinkovitost fotosistema II. Efektivna učinkovitost fotosistema II mjera je udjela svjetlosti apsorbirane klorofilom vezanima uz fotosistem II i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama.

3. Stopa prijenosa elektrona („electron transport rate“, ETR)

$$ETR = \phi_{PSII} \times PFD \times 0,5$$

ETR = stopa prijenosa elektrona

ϕ_{PSII} = efektivna učinkovitost fotosistema II

PFD = intenzitet svjetlosti

S obzirom na to da ϕ_{PSII} predstavlja efektivnu učinkovitost fotokemijske reakcije na fotosistemu II, ta se veličina može koristiti u izračunu stope necikličkog prijenosa elektrona. PFD („photon flux density“) je intenzitet apsorbirane svjetlosti ($\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Faktor 0,5 uzima se zbog pretpostavke o jednakoj ekscitaciji fotosistema I i fotosistema II.

4. Fotokemijsko gašenje (qP)

$$qP = \frac{(F'_m - F_s)}{(F'_m - F'_0)}$$

qP = fotokemijsko gašenje

F'_m = maksimalna fluorescencija u biljci prilagođenoj na uvjete svjetla

F_s = fluorescencija ravnotežnog stanja

F'_0 = minimalna fluorescencija u biljci prilagođenoj na uvjete svjetla

Fotokemijsko gašenje, qP , je mjera koja govori o redoks – stanju plastokinona koji je primarni akceptora elektrona s fotosistema II. Pokazatelj je udjela oksidiranih reakcijskih centara na fotosistemu II.

5. Nefotokemijsko gašenje (NPQ)

$$NPQ = \frac{(F_m - F'_m)}{F'_m}$$

NPQ = nefotokemijsko gašenje

F_m = maksimalna fluorescencija u biljci prilagođenoj na uvjete tame

F'_m = maksimalna fluorescencija u biljci prilagođenoj na uvjete svjetla

Nefotokemijsko gašenje, NPQ , mjera je koja pokazuje koliko se energije oslobodilo u obliku topline, a povezano je s promjenom pH vrijednosti lumena tilakoidnih membrana.

3.3 Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina mjerenja dobivenih pokusima. Odstupanje od aritmetičke sredine izraženo je kao standardna pogreška. Usporedba dobivenih rezultata provedena je analizom varijance (one-way ANOVA), te uporabom Newman-Keuls testa pomoću računalnog programa STATISTICA 12.0 (Stat Soft Inc.,

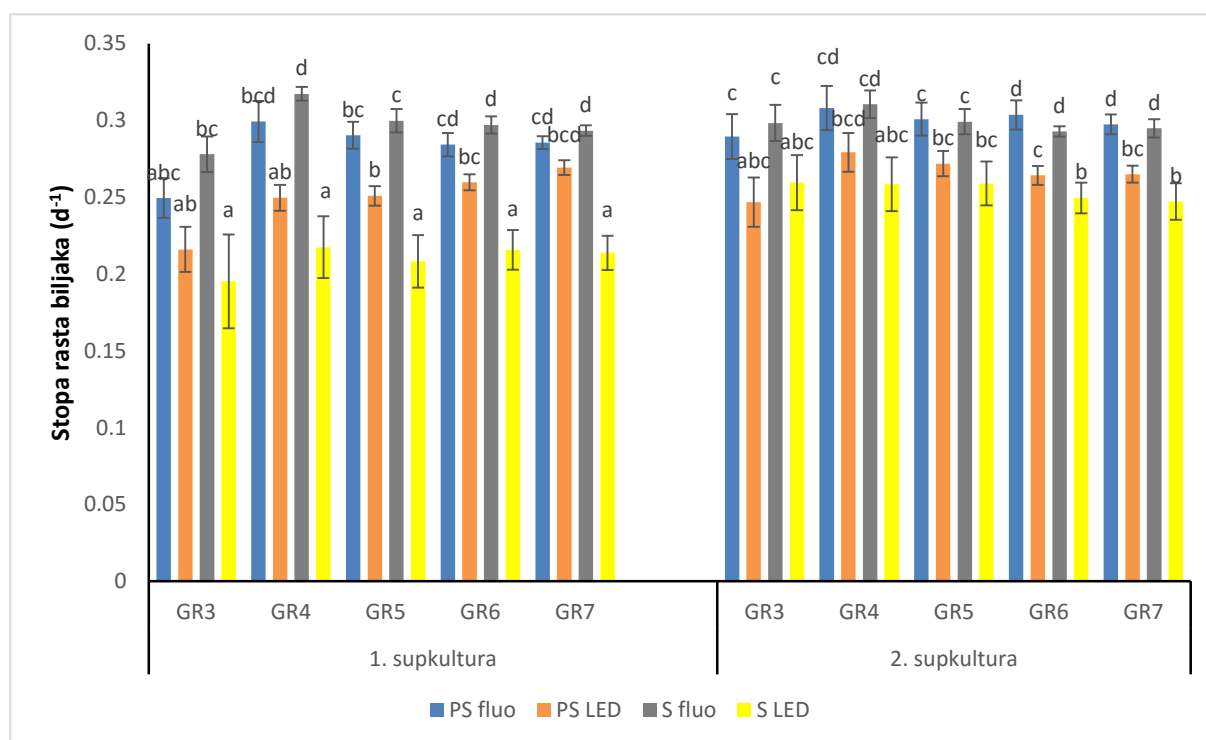
SAD). Statistički značajnim smatrala sam rezultate koji su se razlikovali na razini $p \leq 0,05$.

4.1 Lemna – test

Učinak različitih izvora svjetlosti na vodenu leću istražen je provođenjem statičkog Lemna-testa. Biljke su nasađene na hranjive podloge po Steinbergu (podloga S) te po Pirsonu i Seidelu (podloga PS) i održavane u klima komori pri dva različita izvora svjetlosti, fluorescentnoj i LED rasvjeti. Tijekom 14 dana pokusa pratila sam stopu rasta biljaka i prirast broja kolonija, a prirast svježe mase, omjer suhe i svježe tvari, ukupnu površinu biljaka, koncentraciju topivih proteina, aktivnost enzima gvakol peroksidaze i koncentraciju klorofila *a*, klorofila *b* te karotenoida odredila sam nakon 7. i 14. dana pokusa.

4.1.1 Stopa rasta biljaka

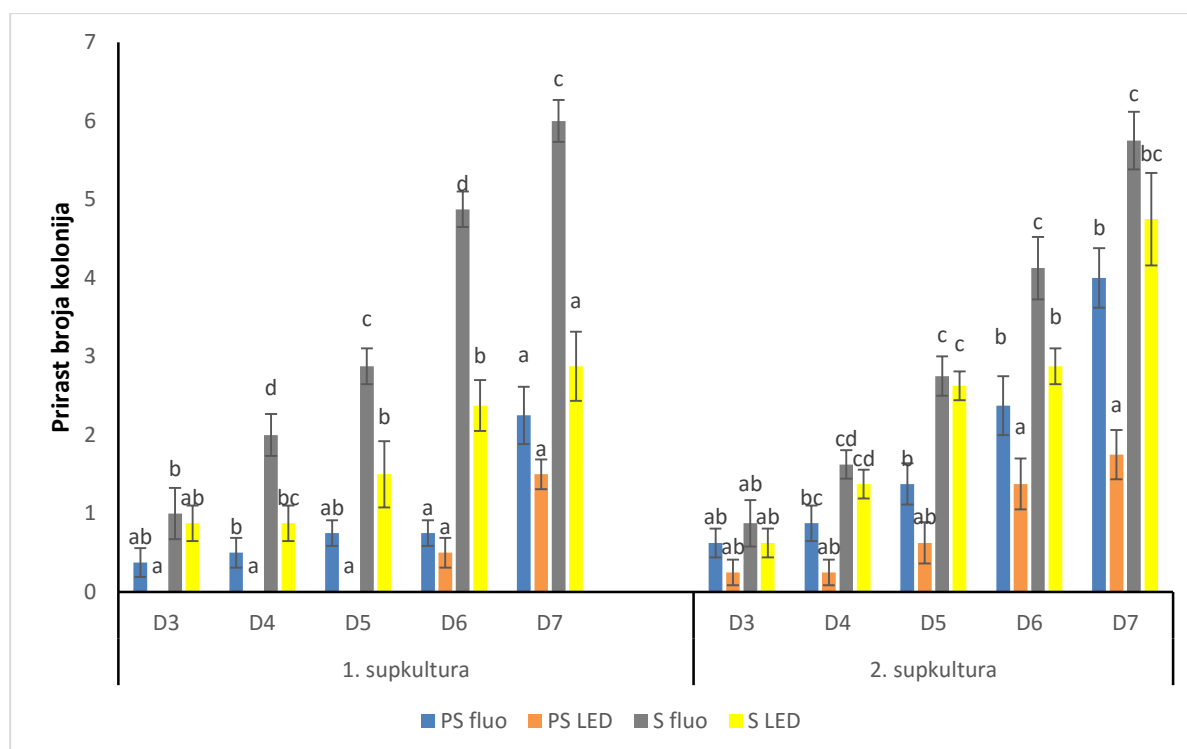
Broj biljaka vodene leće povećavao se tijekom pokusa. Pri usporedbi rasta biljaka uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti s rastom biljaka na istovrsnoj hranjivoj podlozi (PS ili S) koje su bile izložene LED rasvjeti, uočila sam veće stope rasta biljaka pod fluorescentnom rasvjetom. Stopa rasta biljaka statistički je značajno veća kod biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu pri fluorescentnoj rasvjeti u prvoj supkulturi u usporedbi s biljkama koje su rasle na podlozi S izložene LED rasvjeti, dok u drugoj supkulturi ta razlika između biljaka koje su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti (a rasle su na podlozi S) više nije bila statistički značajna. Kod biljaka uzgajanih na podlozi PS nije bilo statistički značajnih razlika sve do šestog i sedmog dana u drugoj supkulturi kada se očituje statistički značajan porast vrijednosti stopa rasta pri fluorescentnoj rasvjeti u usporedbi s LED rasvjetom (Slika 11). Ako uspoređujemo rast biljaka na PS i S podlozi kod biljaka uzgajanih na fluorescentnoj rasvjeti nema statistički značajnih razlika. Iako su nešto veće vrijednosti stope rasta na podlozi po Steinbergu ta se razlika s vremenom smanjila pa je u drugoj supkulturi gotovo i nije bilo.



Slika 11: Stopa rasta biljaka od trećeg do sedmog dana pokusa (GR3 – GR7) u dvije supkulture (ukupno 14 dana) na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj (plavi i sivi stupići) i LED rasvjeti (narančasti i žuti stupići). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

4.1.2 Prirast broja kolonija

Biljke uzgajane na podlozi PS imaju tendenciju stvaranja manjeg broja kolonija s većim brojem biljaka (5 – 8), dok biljke uzgajane na podlozi S formiraju veći broj kolonija s manjim brojem biljaka (2 – 4). Prirast broja kolonija bio je veći u drugoj supkulturi nego u prvoj supkulturi za sve tretmane. Svi tretmani pokazuju statistički značajan porast vrijednosti prirasta broja kolonija u usporedbi s biljkama uzgajanim na PS podlozi pri LED rasvjeti (Slika 12).



Slika 12: Prirast broja kolonija od trećeg do sedmog dana pokusa (D3 – D7) u dvije supkulture (ukupno 14 dana) na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj (plavi i sivi stupići) i LED rasvjeti (narančasti i žuti stupići). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

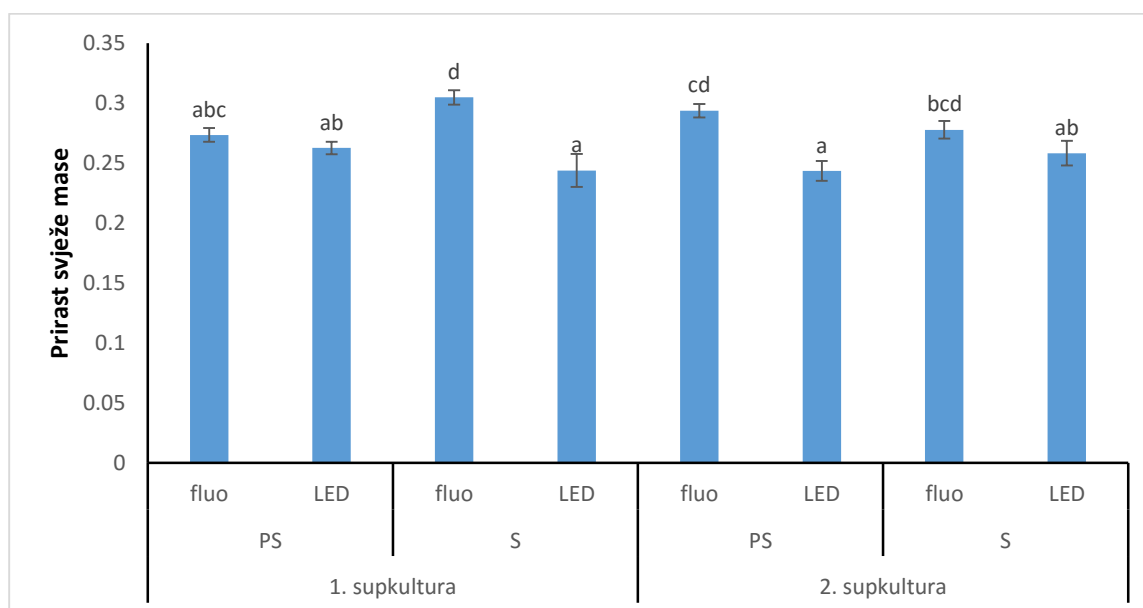
4.1.3 Prirast svježje mase biljaka

Kod biljaka uzgajanih na istovrsnoj podlozi vidljiva je tendencija boljeg rasta pri fluorescentnoj rasvjeti. Kod biljaka uzgajanih na podlozi po Pirsonu i Seidelu tendencija je bila vidljiva u obje supkulture, ali je statistički značajna samo u drugoj supkulturi, a kod biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu je ta razlika bila značajna u prvoj supkulturi. Kod uzgoja biljaka pri istovrsnom izvoru svjetlosti u prvoj supkulturi veći prirast su pokazivale biljke uzgajane na podlozi po Steinbergu pri fluorescentnoj rasvjeti a to je ujedno bio i najveći prirast koji se statistički razlikuje od svih ostalih tretmana u prvoj supkulturi. Najmanji prirast pokazale su biljke uzgajane na podlozi po Steinbergu pri LED rasvjeti ali razlika nije statistički značajna. U drugoj supkulturi najmanji prirast mase pokazale su biljke uzgajane na podlozi PS pri LED rasvjeti te je

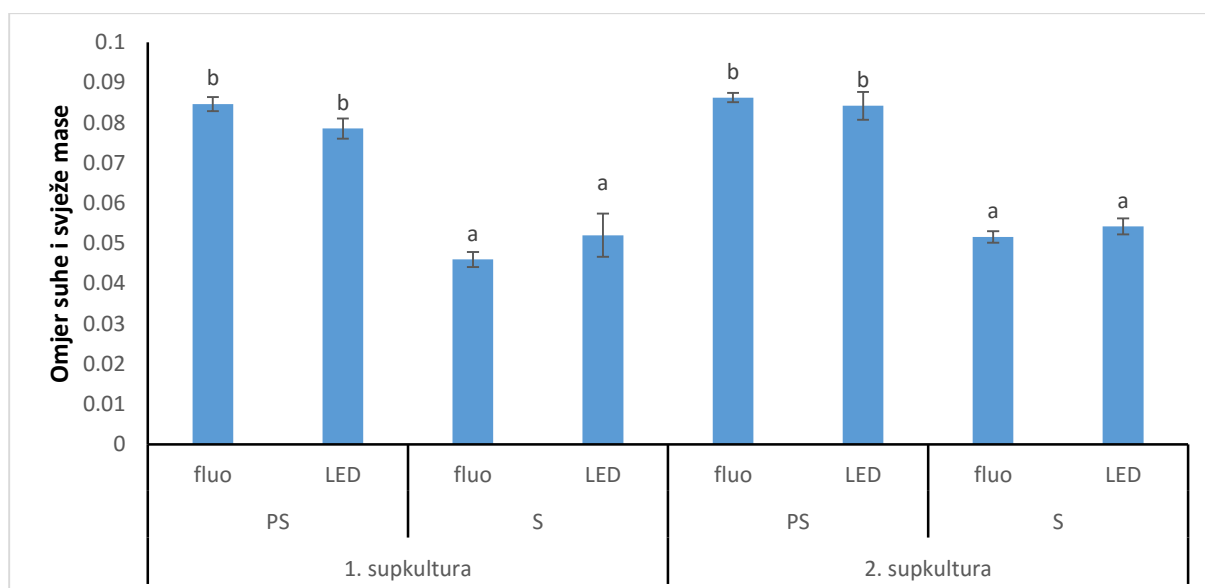
taj pad statistički značajan u odnosu na ostale tretmane, osim u odnosu na biljke na podlozi S pri LED rasvjeti. Ako uspoređujemo masu biljaka na različitim podlogama koje su izložene istom izvoru svjetlosti, u drugoj supkulturi nije postojala statistički značajna razlika (Slika 13).

4.1.4 Omjer suhe i svježe mase

Omjer suhe i svježe mase statistički se značajno razlikovao u biljaka uzgajanih na različitim hranidbenim podlogama. Pri usporedbi omjera suhe i svježe mase u biljaka uzgajanih na istovrsnim podlogama ali pri različitim izvorima svjetlosti nije utvrđena statistički značajna razlika, kao ni kod usporedbe omjera suhe i svježe mase tih biljaka u prvoj i drugoj supkulturi. Općenito, masa svježe tvari nije ukazivala na značajnu razliku među hranidbenim podlogama pri istom osvjetljenju, uz iznimku biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu pri fluorescentnoj rasvjeti koja su imale veći udio vode u svježoj masi (Slika 14).



Slika 13: Prirast svježe mase biljaka sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

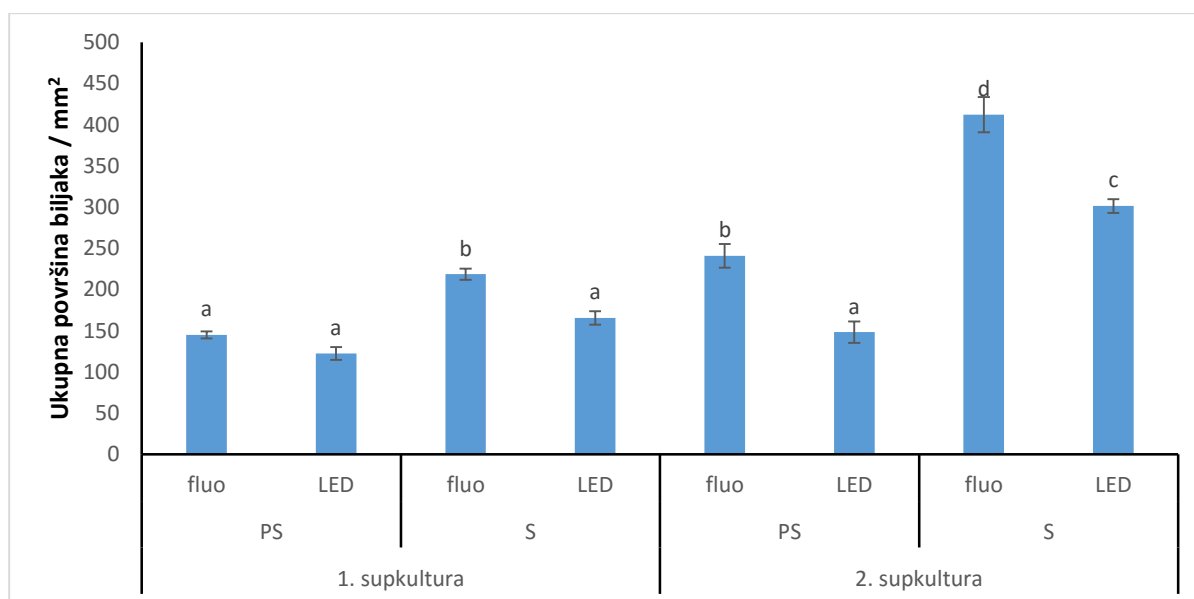


Slika 14: Omjer suhe i svježe mase sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa. Prirast svježe mase sedmog i četrnaestog dana pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

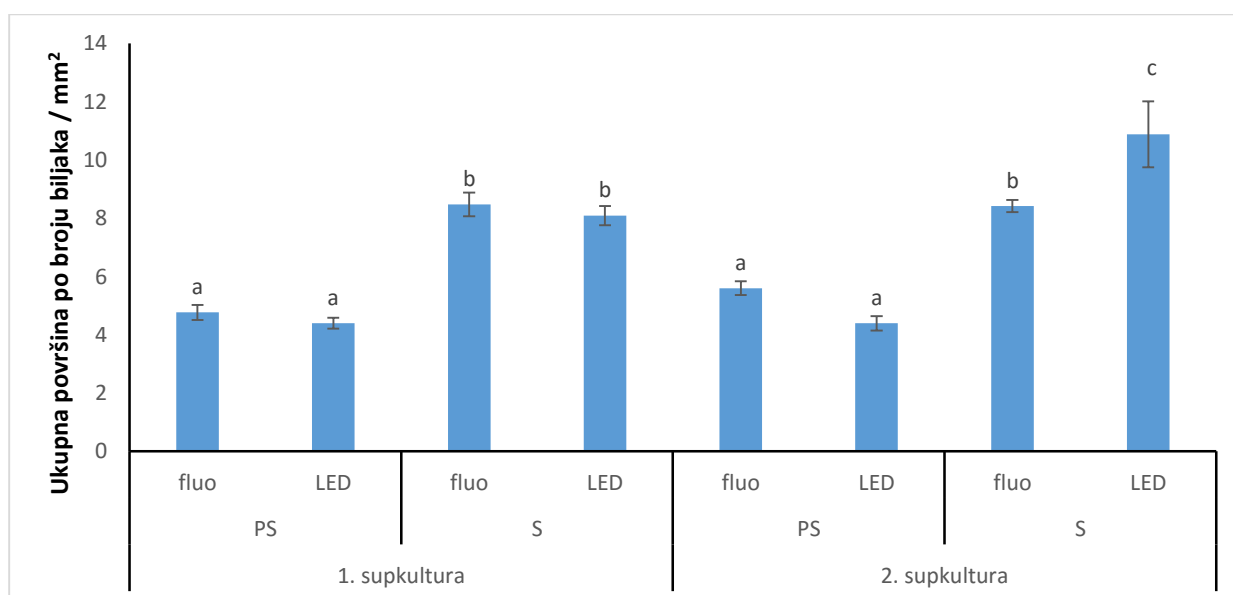
4.1.5 Površina biljaka

Ukupna površina biljaka bila je veća kod biljaka koje su uzgajane pri fluorescentnoj nego pri LED rasvjeti. Kod biljaka uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti statistički značajno veću površinu imale su biljke uzgajane na podlozi po Steinbergu. Kod biljaka uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti veću površinu imale su također biljke uzgajane na podlozi po Steinbergu, ali je ta razlika bila statistički značajna samo u drugoj supkulturi (Slika 15).

Osim ukupne površine biljaka rezultati su izraženi i kao ukupna površina po broju biljaka, odnosno izračunata je prosječna površina pojedine biljke. Ako uspoređujemo površinu biljke na PS podlozi, ona je bila statistički značajno manja od površine biljke na S podlozi. Ako uspoređujemo površinu biljke pri različitom izvoru svjetlosti, a na istoj hranidbenoj podlozi, ona je bila statistički značajno veća samo kod biljaka iz druge supkulture uzgajanih na S podlozi pri LED svjetlu (Slika 16).



Slika 15: Ukupna površina biljaka sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).



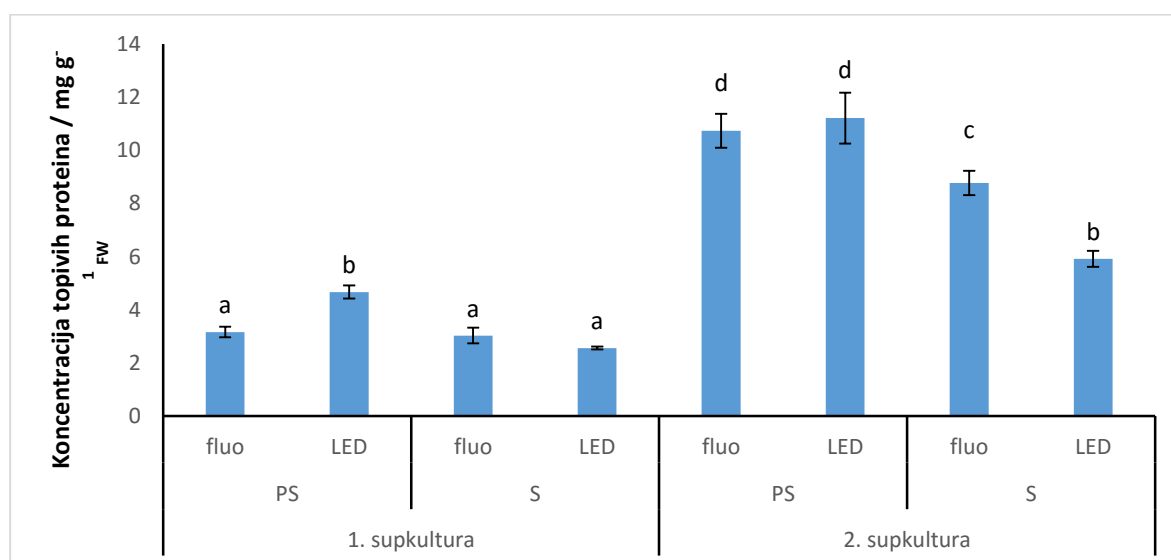
Slika 16: Ukupna površina po broju biljaka sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

4.1.6 Koncentracija topivih proteina

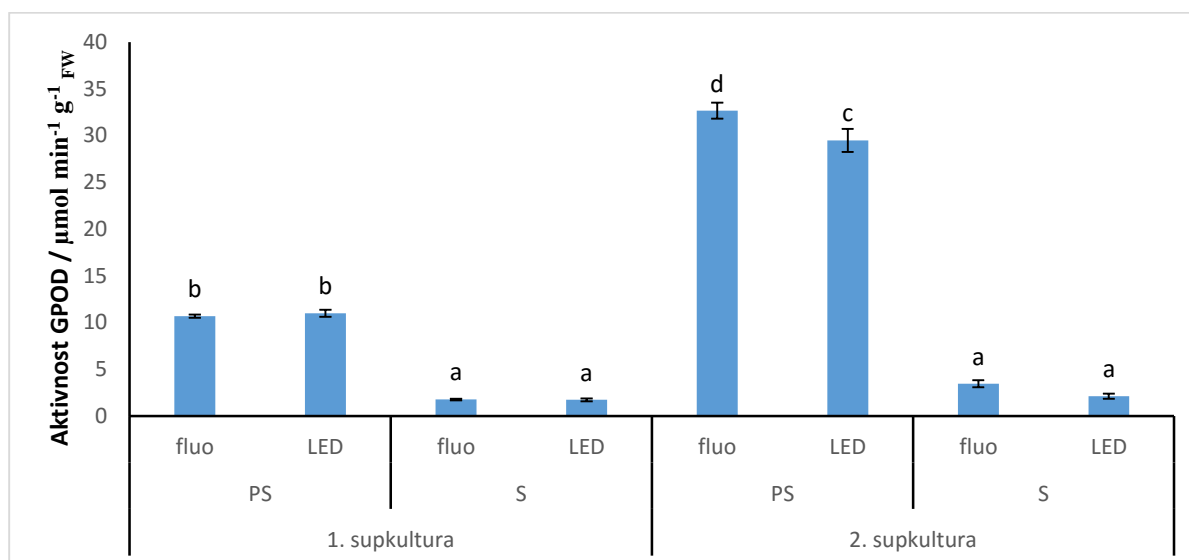
Ukupna koncentracija topivih proteina bila je značajno veća u drugoj supkulturi. Koncentracija topivih proteina bila je veća je kod biljaka uzgajanih na PS podlozi, a razlika je statistički značajna u drugoj supkulturi. Kod biljaka uzgajanih na PS podlozi veće su bile vrijednosti kod onih uzgajanih pri LED rasvjeti, u prvoj supkulturi razlika je statistički značajna, a u drugoj nije. Kod biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu veće su bile vrijednosti kod onih uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti, u drugoj supkulturi ta je razlika značajna, a u prvoj nije (Slika 17).

4.1.7 Aktivnost gvajakol peroksidaze

Kod aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze bio je veći utjecaj hranidbene podloge, nego tipa rasvjete. Vrijednosti su bile statistički značajno veće kod biljaka uzgajanih na PS podlozi. Na PS podlozi veće su vrijednosti kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti. U prvoj supkulturi razlika je statistički značajna, u drugoj se gubi. Na S podlozi veće su vrijednosti pri fluorescentnoj rasvjeti. U prvoj supkulturi ta razlika nije statistički značajna, dok u drugoj jest (Slika 18).



Slika 17: Koncentracija topivih proteina sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).



Slika 18: Aktivnost gvajakol peroksidaze sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

4.1.8 Koncentracija fotosintetskih pigmenata

4.1.8.1 Koncentracija klorofila *a*

Koncentracija klorofila *a* bila je značajno veća kod biljaka u prvoj supkulturi nego kod biljaka u drugoj supkulturi. Vrijednosti kod biljaka uzgajanih na PS podlozi bile su veće, ali razlika nije statistički značajna. Veće su vrijednosti kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti, u prvoj supkulturi razlika nije značajna, ali u drugoj jest (Slika 19).

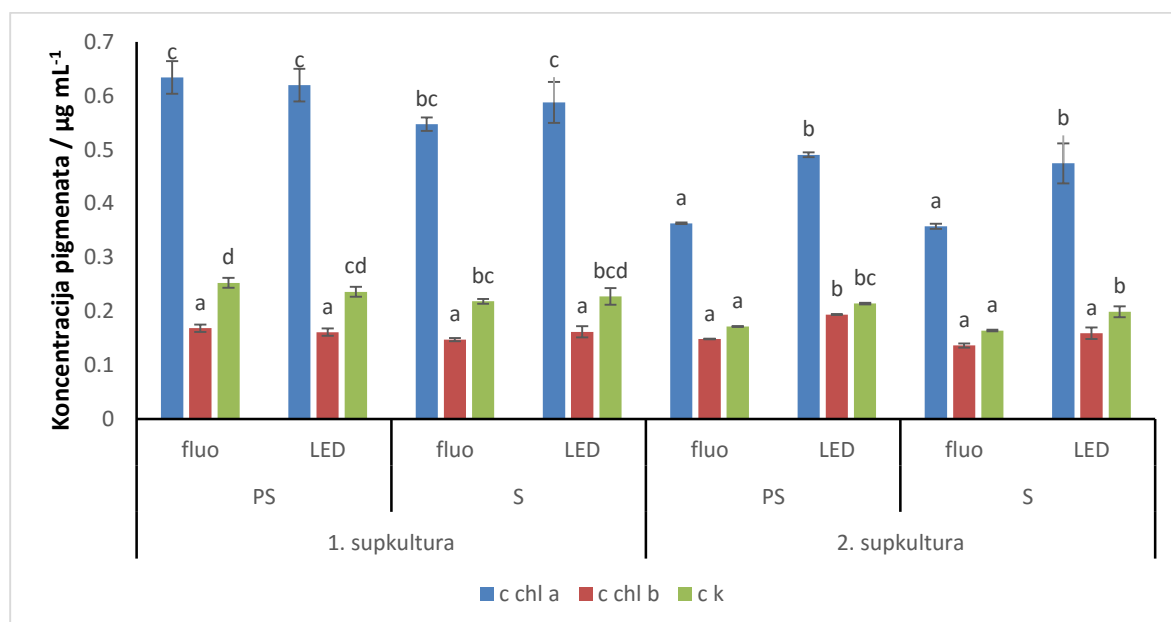
4.1.8.2 Koncentracija klorofila *b*

Koncentracija klorofila *b* bila je podjednaka u svih biljaka. Statistički značajan porast vidljiv je samo kod biljaka koje su uzgajane na PS podlozi pri LED rasvjeti u drugoj supkulturi (Slika 19).

4.1.8.3 Koncentracija karotenoida

Koncentracija karotenoida bila je veća u prvoj supkulturi nego u drugoj. Unutar prve supkulture nema statistički značajnih razlika. U drugoj supkulturi veće su vrijednosti kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti. U prvoj supkulturi ta razlika nije značajna, a u drugoj jest. Među vrijednostima hranidbenih podloga nema razlika (Slika 19).

Međusobno su uspoređivani podaci za pojedine pigmente u svim postojećim tretmanima u pokusu.



Slika 19: Koncentracija fotosintetskih pigmenata sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

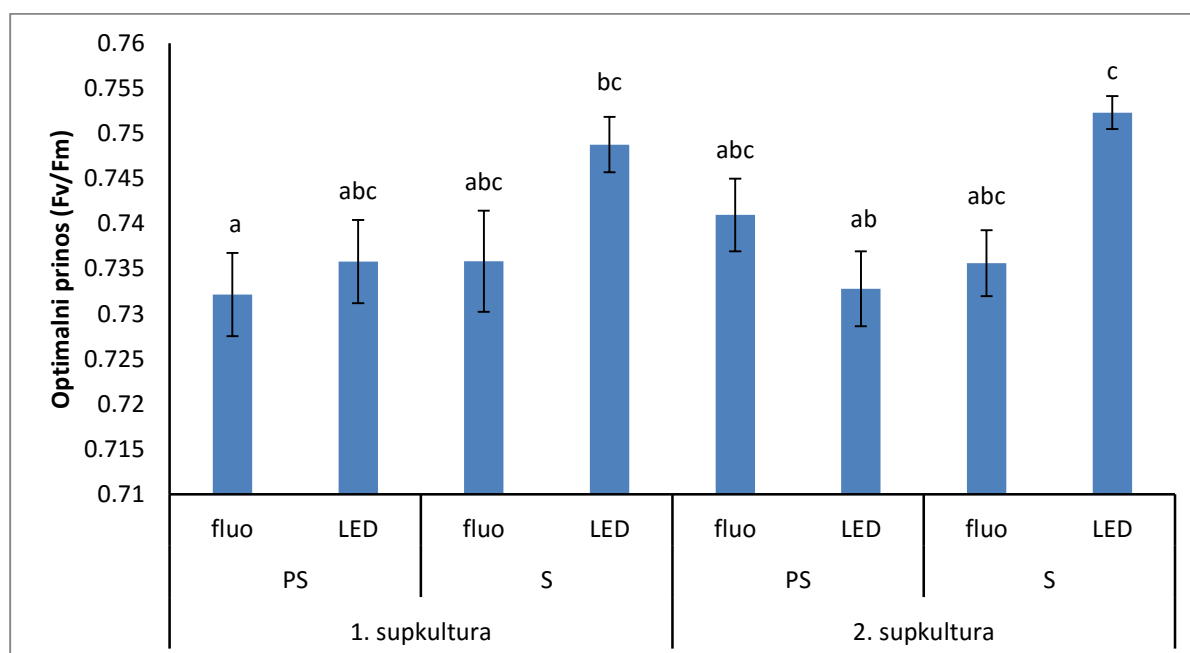
4.2 Učinkovitost fotosinteze

Kako bih istražila učinak različitih izvora svjetlosti na fotosintezu nakon 7 i 14 dana pokusa izmjerila sam fluorescenciju klorofila *a in vivo*. Iz izmjerenih podataka odredila sam učinkovitost PSII na temelju optimalnog prinosa PSII, efektivne

učinkovitosti PSII, stope prijenosa elektrona te fotokemijskog i nefotokemijskog gašenja fluorescencije.

4.2.1 Optimalni prinos fotosustava II

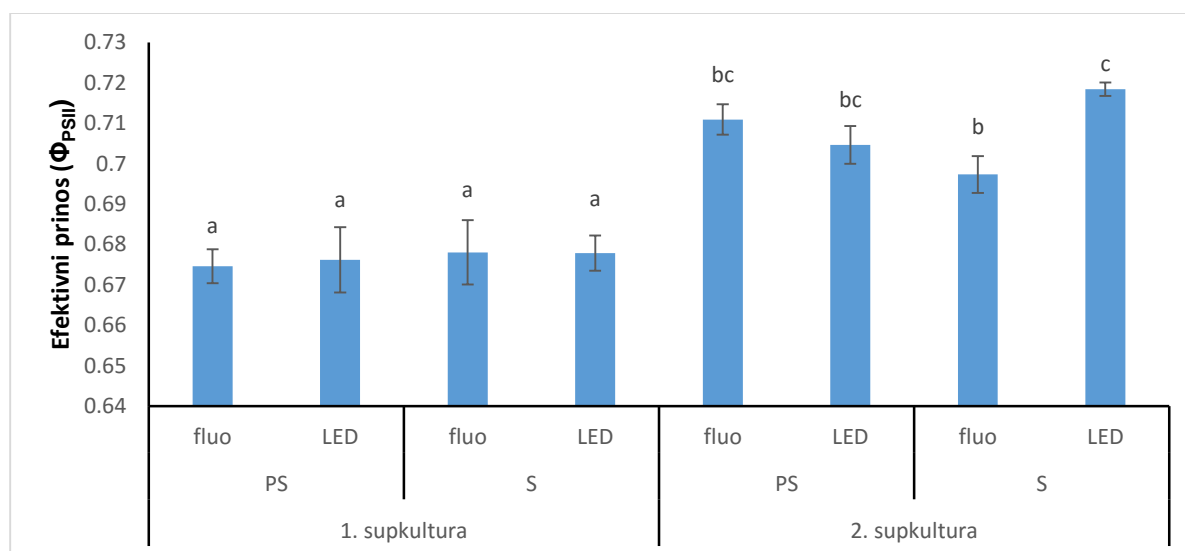
Optimalni prinos fotosustava II iznosio je od 0,72 do 0,75. Vrijednosti su podjednake kod svih tretmana. Vidljiva je tendencija porasta kod biljaka uzgajanih pri LED svjetlu, ali je razlika statistički značajna samo kod biljaka uzgajanih na S podlozi u drugoj supkulturi. Ostali tretmani ne razlikuju se ni u usporedbi dviju različitih podloga (Slika 20).



Slika 20: Optimalni prinos PSII sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu S. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

4.2.2 Efektivni prinos fotosustava II

Efektivni prinos iznosio je od 0,67 do 0,72. Vrijednosti su statistički značajno veće kod biljaka iz druge supkulture. Unutar prve supkulture nema razlika ni među podlogama ni među rasvjetom. U drugoj supkulturi na PS podlozi vrijednosti su bile veće kod onih biljaka koje su uzgajane pri fluorescentnoj rasvjeti, ali razlika nije statistički značajna. Kod biljaka uzgajanih na S podlozi veća je bila vrijednost pri LED rasvjeti i ta je razlika statistički značajna (Slika 21).

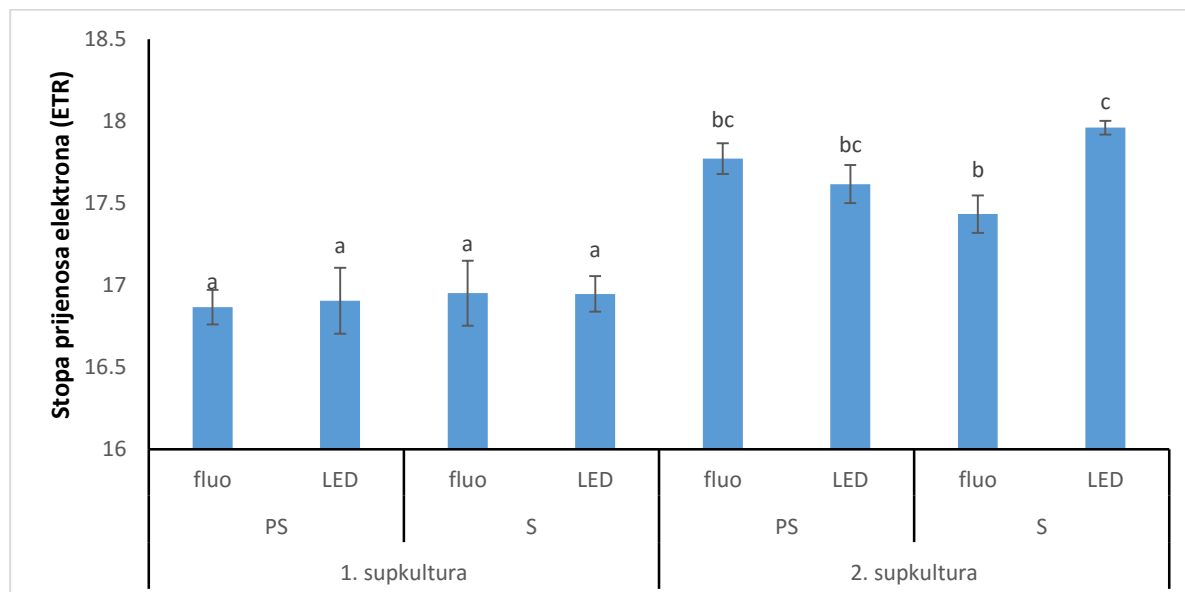


Slika 21: Efektivni prinos PSII sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi PS i podlozi S. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

4.2.3 Stopa prijenosa elektrona – ETR

Stopa prijenosa elektrona iznosila je od 17,96 do 19,86. Vrijednosti su statistički značajno veće kod biljaka iz druge supkulture. Unutar prve supkulture nema razlika ni među podlogama ni među rasvjetom. Također nema razlike ni u usporedbi dviju hranidbenih podloga. U drugoj supkulturi na PS podlozi veće su bile vrijednosti kod biljaka uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti, ali razlika nije statistički

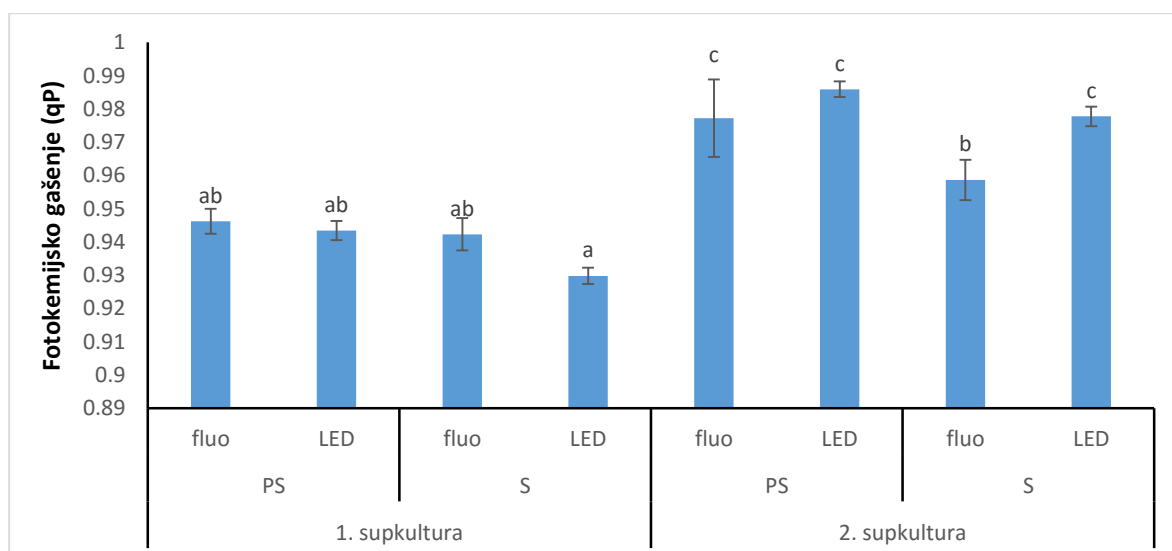
značajna. Kod biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu veća je bila vrijednost pri LED rasvjeti i ta je razlika statistički značajna (Slika 22).



Slika 22: Stopa prijenosa elektrona sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

4.2.4 Fotokemijsko gašenje

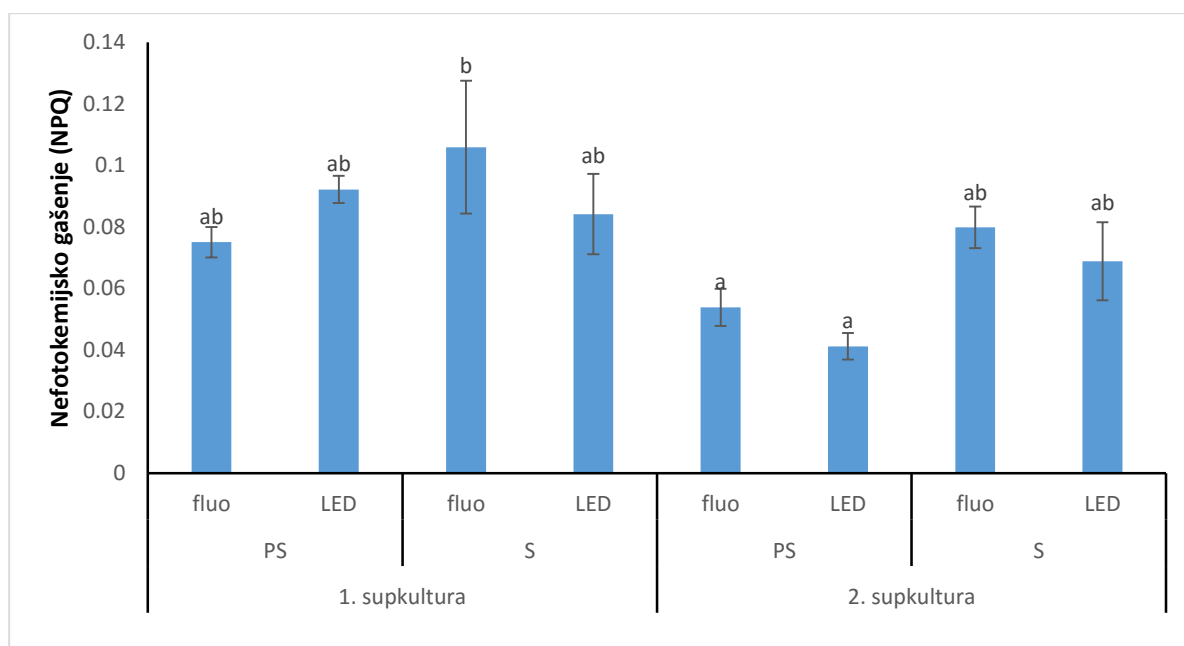
Fotokemijsko gašenje iznosilo je od 0,93 do 0,99. U prvoj supkulturi bio je vidljiv pad vrijednosti kod biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu pri LED rasvjeti, ali razlika nije statistički značajna. U drugoj supkulturi veće su vrijednosti kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti. Na PS podlozi ta razlika nije statistički značajna dok je kod biljaka uzgajanih na S podlozi razlika statistički značajna (Slika 23).



Slika 23: Fotokemijsko gašenje sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

4.2.5 Nefotokemijsko gašenje

Vrijednosti nefotokemijskog gašenja bile su od 0,04 do 0,10. Vidljiv je pad vrijednosti u drugoj supkulturi. Vrijednosti nefotokemijskog gašenja veće su kod biljaka uzgajanih na S podlozi nego kod onih uzgajanih na PS podlozi, ali razlike nisu statistički značajne. Vrijednosti su veće kod biljaka uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti, osim kod onih uzgajanih na PS podlozi iz prve supkulture, ali te razlike nisu statistički značajne (Slika 24).



Slika 24: Nefotokemijsko gašenje sedmog (1. supkultura) i četrnaestog dana (2. supkultura) dana pokusa na podlozi podlozi po Pirsonu i Seidelu i podlozi po Steinbergu. Biljke su bile izložene fluorescentnoj i LED rasvjeti. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 8 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$, Newman Keuls test).

5.1 Ovisnost parametara rasta vodene leće o različitim izvorima svjetlosti

Rast vodene leće pratila sam Lemna-testom. Kao osnovni parametar pratila sam promjenu broja listića, uz što je obavezno mjeriti drugi parametar koji može biti površina listića ili masa suhe tvari (ISO/CD 20079). Prema ISO standardu biljke se uzgajaju na hranidbenoj podlozi po Steinbergu, a vrijeme trajanja testa je sedam dana tijekom kojeg porast broja biljaka mora biti eksponencijalan. Kako su biljke uzgajane u dvije supkulture, što znači da su nakon sedam dana premještene na svježu hranjivu podlogu, vrijeme trajanja testa produljeno je na 14 dana. U ovom istraživanju biljke su osim na hranidbenoj podlozi po Steinbergu uzgajane i na hranidbenoj podlozi po Pirsonu i Seidelu koja se inače u laboratorijskim uvjetima koristi za dugotrajno održavanje vodene leće. Intenzitet svjetlosti kojem je vodena leća izlagana tijekom uzgoja bio je $\sim 50 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, što je niže od $85 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, propisanog standardiziranim Lemna-testom (ISO/CD 20079), a temperatura je bila $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nakon izlaganja različitim izvorima svjetlosti, stopa rasta je značajno porasla trećeg dana pokusa (Slika 11), a zatim je uslijedio daljnji eksponencijalan rast na obje hranidbene podloge. U ovom istraživanju utvrđeno je da je stopa rasta podjednaka kod biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu te onih uzgajanih na podlozi po Pirsonu i Seidelu pri fluorescentnoj rasvjeti, dok je kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti stopa rasta biljaka veća na hranidbenoj podlozi po Pirsonu i Seidelu. Lozić (2010) je izmjerila stopu rasta vodene leće od $\sim 0,18 \text{ d}^{-1}$ na hranidbenoj podlozi po Steinbergu pri intenzitetu osvjetljenja fluorescentne rasvjete od $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a Sorić (2011) $0,24 \text{ d}^{-1}$ na hranidbenoj podlozi po Pirsonu i Seidelu pri intenzitetu osvjetljenja fluorescentne rasvjete od $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ što odgovara i rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

Iako je u ovom radu apsolutni iznos stope rasta biljaka bio veći na podlozi po Steinbergu u prvoj supkulturi, u drugoj supkulturi te razlike više nije bilo što potvrđuje činjenicu da je hranidbena podloga po Pirsonu i Seidelu bogatija i time bolja za dugotrajnija istraživanja te da su biljke uzgajane na podlozi po Steinbergu podložnije utjecajima iz okoliša. Bolji rast na podlozi po Pirsonu i Seidelu dobiven je također i u istraživanju utjeka kadmija na vodenu leću (Šarić 2001, citirano u Lozić 2010) te u istraživanju utjecaja talijeva(I) acetata na vodenu leću (Babić i sur. 2009). Podloga po

Pirsonu i Seidelu sadrži šećer saharozu i aminokiselinu asparagin, a također su i koncentracije makro- i mikroelemenata više. Upravo asparagin i saharoza imaju pozitivan učinak na prirast biljaka u uvjetima loše opskrbe hranjivim tvarima ili slabijeg intenziteta svjetlosti. Poznato je da biljke iz porodice *Lemnaceae* mogu rasti u širokom rasponu koncentracija hranjivih tvari, a kraće vrijeme čak i u destiliranoj vodi. Iako mogu preživjeti danima i tjednima, koristeći hranjive tvari akumulirane u starijim listićima, dugotrajniji kontinuirani prirast biljaka moguć je samo u otopinama s relativno visokom koncentracijom hranjivih tvari (Landolt i Kandeler 1987, citirano u Lozić 2010) ili uz periodičnu izmjenu hranjive podloge.

Neovisno o podlozi na kojoj su biljke uzgajane, stopa rasta biljaka bila je viša kod biljaka koje su rasle pri fluorescentnoj nego pri LED rasvjeti. Razlika je vidljivija u drugoj supkulturi jer se tijekom vremena pokazalo da fluorescentna rasvjeta bolje potiče rast biljaka u usporedbi s LED rasvjetom. Bantis i sur. (2016) pratili su utjecaj četiri različite LED lampe na rast i ukupnu količinu fenolnih spojeva kod bosiljka. U svom su istraživanju kao kontrolnu rasvjetu koristili fluorescentnu rasvjetu. Dobiveni rezultati pokazuju varijabilne podatke o stopi rasta biljaka. Neke biljke pokazuju veću stopu rasta u usporedbi s kontrolnim biljkama, a neke manju.

Prirast broja kolonija na podlozi po Steinbergu bio je linearan, a na podlozi po Pirsonu i Seidelu nije bio tako pravilan kao na podlozi po Steinbergu (Slika 12). Biljke koje su uzgajane na podlozi po Pirsonu i Seidelu imale su tendenciju stvaranja manjeg broja kolonija sa većim brojem biljaka dok je na podlozi po Steinbergu uočena tendencija stvaranja većeg broja kolonija sa manjim brojem biljaka. Kolonije biljaka uzgajane na podlozi po Pirsonu i Seidelu odvajale su se od matičnih kolonija kada su one dosegle osam biljaka, a na podlozi po Steinbergu već kod četiri biljke. Broj biljaka u koloniji je također pokazatelj stresa. Manji broj biljaka u koloniji ukazuje na stresne uvjete i način zaštite matične kolonije od nepovoljnih uvjeta.

Prirast svježe mase tvari također ukazuje na bolji razvitak biljaka uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti (Slika 13). Razlike u prirastu svježe mase ovisno o izvoru svjetlosti nisu bile značajne na podlozi po Pirsonu i Seidelu dok su na podlozi po Steinbergu razlike bile statistički značajne. Lozić (2010) je izmjerila prirast mase $\sim 0,12$ u biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu pri osvjetljenju fluorescentnim svjetiljkama intenziteta $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a omjer suhe i svježe mase je iznosio 0,7 kod

biljaka uzgajanih na istoj hranidbenoj podlozi u istim svjetlosnim uvjetima. Bantis i sur. (2016) su u svom istraživanju izmjerili veći omjer suhe i svježje mase bosiljka kod kontrolnih biljaka uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti, u usporedbi s onima uzgajanima pri LED rasvjeti. Iako je u ovom radu omjer suhe i svježje mase manji kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti (Slika 14), razlike nisu bile statistički značajne. Na masu biljaka najviše utječe sadržaj vode, ali i koncentracija proteina i škroba. Omjer suhe i svježje mase veći je što je veći udio proteina i škroba. Sadržaj topivih proteina porastao je tijekom vremena (Slika 17) te je i to pokazatelj aklimatizacije biljaka na uvjete rasta. Sadržaj proteina veći je kod biljaka uzgajanih na podlozi po Pirsonu i Seidelu. Razlog tome je što se u podlozi po Pirsonu i Seidelu nalazi i aminokiselina asparagin koja služi kao izvor dušika u biosintezi ostalih aminokiselina koje izgrađuju proteine te saharoza iz koje mogu nastati i drugi organski spojevi, uključujući aminokiseline i proteine. Također sadržaj proteina veći je kod biljaka koje su uzgajane pri LED rasvjeti.

Još jedan parametar koji govori u korist upotrebe fluorescentne rasvjete jest ukupna površina biljaka (Slika 15). Utvrđeno je da je bila značajno veća kod onih biljaka koje su uzgajane pri fluorescentnoj rasvjeti. Ovu činjenicu potvrđuje i izmjerena aktivnost enzima gvajakol peroksidaze (Slika 18) koji, uz nekoliko drugih uloga u stanici, sudjeluju i u procesima modifikacije stanične stijenke (Lepeduš i sur. 2004). Veća aktivnost ovog enzima može ukazivati na veći udio elemenata sekundarne stanične stijenke i stoga manju mogućnost daljnjeg rasta stanice, a time i povećanja površine biljke. Aktivnost enzima gvajakol peroksidaze bila je statistički značajno veća kod biljaka uzgajanih na podlozi po Pirsonu i Seidelu, a i izmjerena prosječna površina biljke na podlozi po Pirsonu i Seidelu u skladu je s ovom pretpostavkom.

5.2 Ovisnost koncentracije fotosintetskih pigmenata vodene leće o različitim izvorima svjetlosti

Ako usporedimo koncentracije pigmenata klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida vodene leće uzgajane na podlozi po Steinbergu i na podlozi po Pirsonu i Seidelu, možemo uočiti pad koncentracije klorofila *a* i *b* te blagi porast koncentracije karotenoida na podlozi po Steinbergu u drugoj supkulturi, dok u prvoj supkulturi

razlike nije bilo (Slika 19). Rezultati u ovom istraživanju poklapaju se s rezultatima istraživanja koje su provele Lozić (2010) i Sorić (2011). Osim što hranidbena podloga po Pirsonu i Seidelu sadrži aminokiselinu asparagin i šećer saharozu, sadrži i kelatne spojeve, EDTA i željezov citrat. Kelatni spojevi čine mikroelemente u podlozi dostupnijim biljkama (Landolt i Kandeler 1987, citirano u Lozić 2010). Smanjena količina klorofila može biti posljedica smanjene stope sinteze ili povećane razgradnje klorofila zbog manje dostupnosti željeza (Pevalek-Kozlina 2003) biljkama uzgajanim na podlozi po Steinbergu. Ipak, u mojem istraživanju je veći utjecaj na koncentraciju klorofila imala vrsta rasvjete pri kojoj su biljke uzgajane. Koncentracija klorofila *a* značajno je viša kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti u drugoj supkulturi (Slika 19). Budući da su intenziteti jednog i drugog izvora svjetlosti podjednaki, mogu pretpostaviti da razlog tome leži u razlici u emisijskim spektrima fluorescentne i LED rasvjete. Pri usporedbi biljaka na dvjema različitim podlogama, razlika u koncentraciji klorofila se mogla uočiti i makroskopskim promatranjima jer su listići biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu bili svjetlije zelene boje. Na koncentraciju karotenoida također je veći utjecaj imala rasvjeta pri kojoj su biljke uzgajane nego hranidbena podloga. Biljke koje su uzgajane pri LED rasvjeti imale su u drugoj supkulturi višu koncentraciju karotenoida od onih uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti. Primijećeno povećanje karotenoida mehanizam je prilagodbe suboptimalnim svjetlosnim uvjetima, kakvi su bili prisutni u mojem pokusu. Naime, karotenoidi su pomoćni pigmenti u fotosintezi koji mogu dio apsorbirane svjetlosne energije prenijeti na klorofile (Ostroumov i sur. 2013). U uvjetima previsokog intenziteta svjetlosti karotenoidi imaju zaštitnu ulogu. I u takvim uvjetima u biljci se povećava koncentracija karotenoida koji mogu pri oksidacijskom stresu djelovati kao akceptori energije kako bi se spriječilo oštećenje staničnih struktura reaktivnim oblicima kisika koji nastaju u takvim stresnim uvjetima (Pevalek-Kozlina 2003). No, u mojem istraživanju intenzitet svjetlosti je bio nizak pa se povećanje količine karotenoida može objasniti njihovom ulogom pomoćnih pigmenata u procesu fotosinteze.

Singh i sur. (2014) u svom istraživanju govore o blagotvornom utjecaju LED rasvjete na koncentraciju pigmenata. Primijetili su povećanje koncentracije klorofila kod kelja (*Brassica olearacea* L. cv Winterbor), sadnica kupusa (*Brassica olearacea* var. *capitata* L.) te povećanje koncentracije karotenoida kod biljaka „baby“ salate sorte „Red Cross“ (*Lactuca sativa* L.). Kod rajčice sorte „Magnus F1“ (*Solanum*

lycopersicum L.), slatke paprike sorte „Reda“ (*Capsicum* sp L.) te krastavca (*Cucumis sativum* L.) primijetili su povećanje koncentracije svih fotosintetskih pigmenata u kombinaciji osvjetljavanja biljaka LED rasvjetom i HPS lampama („high pressure sodium lamps“) intenziteta svjetlosti $PFD = 90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

5.3 Utjecaj različitih izvora svjetlosti na učinkovitost fotosinteze vodene leće

Fotosinteza je proces koji ovisi o intenzitetu i kvaliteti svjetlosti. Učinkovitost fotosinteze povećava se proporcionalno s porastom intenziteta svjetlosti sve do jedne točke kad daljnji porast intenziteta svjetlosti ne utječe na porast stope fotosinteze zbog zasićenja fotosintetskog aparata. Ukoliko se intenzitet svjetlosti još više povećava dolazi do pada učinkovitosti fotosinteze zbog nastupanja svjetlosnog stresa i oštećenja fotosintetskog aparata (Pevalek-Kozlina 2003). Artetxe i sur. (2002) proveli su istraživanje o utjecaju cinka i kadmija na fotosintezu vodene leće aklimatiziranu na tri različita intenziteta svjetlosti. U svom istraživanju došli su do zaključka kako je vodena leća koja je uzgajana pri najmanjem intenzitetu svjetlosti (LL – „low light“, $PFD = 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pokazala manje simptome stresa inducirane prisustvom cinka i kadmija. Optimalni prinos fotosistema II i koncentracija klorofila nisu bile promijenjene za razliku od biljaka koje su uzgajane pri srednjem i visokom intenzitetu svjetlosti. Prema tome, očekivala sam da kod uzgoja vodene leće pri različitim izvorima svjetlosti niskog intenziteta neće doći do pojave simptoma svjetlosnog stresa koji se očituju smanjenim optimalnim prinosom fotosistema II. Maxwell i Johnson (2000) u svojim uputama o mjerenju fluorescencije klorofila navode kako se stresni uvjeti koji uzrokuju oštećenje fotosintetskog aparata (npr. svjetlosni, toplotni stres ili manjak vode) očituju smanjenim vrijednostima optimalnog prinosa fotosistema II (normalne vrijednosti su od 0,7 do 0,8) te povećanjem vrijednosti minimalne fluorescencije (F_0). Visoke vrijednosti nefotokemijskog gašenja (NQP) pokazatelj su previsokog intenziteta svjetlosti i niskog fotosintetskog kapaciteta.

U ovom istraživanju vrijednosti optimalnog prinosa fotosustava II bile su u spomenutom rasponu - od 0,7 do 0,8 što približno odgovara očekivanim vrijednostima za biljke koje nisu u uvjetima svjetlosnog stresa (Slika 20). Najviše vrijednosti bile su kod biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu pri LED rasvjeti.

Ostale vrijednosti bile su nešto niže ali ujednačene. Vjerojatan razlog ovakvim rezultatima jest taj što su se biljke uzgajane na podlozi po Steinbergu pri LED rasvjeti prilagodile uvjetima suboptimalne kvalitete i intenziteta svjetlosti. Povećana učinkovitost fotokemijskih reakcija dovodi do veće stope fotosinteze u cjelini pa biljke sintetiziraju dovoljno ugljikohidrata koji su im potrebni kao izvor energije i preteča u biosintezi ostalih organskih spojeva potrebnih za rast i razvoj. Kod biljaka uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti i onima uzgajanih na podlozi po Pirsonu i Seidelu iznos optimalnog prinosa bio je nešto niži. Biljke koje su rasle na podlozi po Pirsonu i Seidelu koristile su aminokiselinu asparagin i saharozu iz hranjive podloge. S obzirom da je optimalan prinos fluorescencije proporcionalan sadržaju klorofila (Genkov i sur. 1997, citirano u Lozić 2010), povećanje optimalnog prinosa može biti posljedica povećanog sadržaja klorofila u vodenoj leći uzgajanoj na podlozi po Steinbergu pri LED rasvjeti u odnosu na sadržaj klorofila u biljkama pod fluorescentnom rasvjetom u drugoj supkulturi.

Efektivna učinkovitost fotosistema II mjera je udjela svjetlosti apsorbirane klorofilom vezanim uz PSII i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama. Efektivni prinos bio je veći u drugom dijelu pokusa u svim pokusnim grupama biljaka (Slika 21) pri čemu su vrijednosti bile podjednake, a značajno niža je bila jedino vrijednost dobivena za biljke na podlazi po Steinbergu izložene fluorescentnoj rasvjeti. U prvoj supkulturi efektivna učinkovitost fotosistema II bila je niža vjerojatno zato što je preseljenje biljke s fluorescentne na LED rasvjetu bilo stresno za biljku i u tako kratkom vremenu se još nije stigla aklimatizirati. Naime, dugotrajni uzgoj biljaka kao i aklimatizacija na dvjema podlogama korištenima u ovom pokusu bili su pri fluorescentnom rasvjetom.

Stopa prijenosa elektrona (*ETR*) predstavlja relativnu količinu elektrona koji prolaze kroz PSII tijekom ravnotežnog stanja fluorescencije. Podaci o stopi prijenosa elektrona (Slika 22) u potpunosti se poklapaju s podacima o efektivnoj učinkovitosti fotosistema II što je i očekivano jer stopa prijenosa elektrona ovisi o efektivnom prinosu fotosistema II.

Fotokemijsko gašenje (*qP*) mjera je za količinu energije koja se iskoristi za reakcije prijenosa elektrona, dok je nefotokemijsko gašenje mjera za količinu energije koja se izgubi u obliku topline (Maxwell i Johnson 2000). Prema tome, što je veći

udio fotokemijskog gašenja, manji je udio nefotokemijskog gašenja i obrnuto. Podaci o fotokemijskom gašenju ukazuju na to da su biljke koje su uzgajane na podlozi po Pirsonu i Seidelu bez obzira na vrstu rasvjete imale visoke vrijednosti fotokemijskog gašenja, odnosno da se radi o optimalnim uvjetima uzgoja. Taj se podatak odnosi na drugu supkulturu. Ukoliko se uspoređuju podaci o fotokemijskom gašenju biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu, više vrijednosti su pokazale biljke uzgajane pri LED rasvjeti u drugoj supkulturi (Slika 23) u odnosu na biljke uzgajane na istoj podlozi pri fluorescentnoj rasvjeti. Vrijednosti nefotokemijskog gašenja veće su kod biljaka uzgajanih pri fluorescentnoj rasvjeti, ali te razlike nisu statistički značajne. U drugoj supkulturi vrijednosti nefotokemijskog gašenja ne ukazuju na nikakve razlike među tretmanima (Slika 24). Zbog niskog intenziteta svjetlosti pri kojem su biljke uzgajane, vrijednosti nefotokemijskog gašenja su prema očekivanjima, niske. Ako usporedim podatke o fotokemijskom i nefotokemijskom gašenju s vrijednostima koje je izmjerila Lozić (2010) podaci o fotokemijskom gašenju se poklapaju dok su vrijednosti o nefotokemijskom gašenju upola niže.

Zanimljivo je to što unatoč višoj učinkovitosti fotokemijskih reakcija biljke uzgajane na podlozi po Steinbergu pri LED rasvjeti nisu u usporedbi s fluorescentnom rasvjetom imale povećanu masu kao ni veći porast broja biljaka. To bi moglo značiti da su se ugljikohidrati sintetizirani u fotosintezi u većoj mjeri iskoristili za dobivanje energije procesima staničnog disanja, a manje su se usmjeravali u proizvodnju biomase. Oksidacijom ugljikohidrata oslobađa se energija pohranjena u obliku ATP-a. Ta se energija zatim koristi u svim metaboličkim procesima organizma kao i za prijenos tvari kroz membrane. Koncentracija mikro- i makro- elemenata u hranidbenoj podlozi po Steinbergu je niža u odnosu na podlogu po Pirsonu i Seidelu pa se može očekivati da je za unos nekih mineralnih tvari potrebno utrošiti više energije u usporedbi s podlogom po Pirsonu i Seidelu. Budući da je ta hranidbena podloga bogatija mineralnim tvarima, mogu pretpostaviti da se veći dio tvari može primati pasivnom difuzijom kroz proteinske kanaliće ili olakšanom difuzijom putem prijenosnika. Zanimljiv je podatak dobiven za površinu biljaka na podlozi po Steinbergu. U drugoj supkulturi je površina biljaka bila veća na podlozi po Steinbergu u usporedbi s podlogom po Pirsonu i Seidelu (Slika 15). Naime, ulazak mikro- i makroelemenata u stanice uvijek je popraćen ulaskom molekula vode (Pevalek-Kozlina 2003), što svakako doprinosi i povećanju površine stanice. Dakle, veća

uključenost sekundarnog aktivnog prijenosa u proces unosa mineralnih elemenata u stanice uz odgovarajući ulazak vode radi uspostavljanja osmotske ravnoteže jedan je od mogućih mehanizama koji doprinose većoj površini biljka. Osim povećanja površine biljaka, ovakvu pretpostavku potvrđuje i podatak o omjeru suhe i svježje mase biljaka. Udio suhe tvari manji je kod biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu, odnosno veći udio u masi biljke čini voda. Napominjem da bi za potvrdu ove pretpostavke o povezanosti površine biljaka i unosa mineralnih tvari trebalo analizirati sastav mineralnih elemenata u biljnom tkivu. Amoozgar i sur. (2016) pratili su učinak različitih tipova LED rasvjete (različiti omjer plave i crvene svjetlosti) na sadnice salate (*Lactuca sativa* L. cv. Grizzly). Kao kontrolnu rasvjetu koristili su fluorescentnu rasvjetu. U svom su istraživanju odredili koncentraciju makro- i mikro- elemenata (N, P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn i Fe) u sadnicama salate. Koncentracija mikro- i makro- elemenata bila je značajno veća kod sadnica uzgajanih pri LED rasvjeti i to u svim ispitivanim tretmanima isto kao i udio vode u korijenu i u nadzemnom dijelu sadnica. Amoozgar i sur. (2016) navode da je razlog tome niska razina stresa uzrokovana promjenama u intenzitetu svjetlosti pri osvjetljavanju LED rasvjetom. Kopsell i Sams (2013, citirano u Amoozgar i sur. 2016) izvjestili su da kratkotrajno izlaganje plavom svjetlu prije berbe povećava hranjivu vrijednost brokule (*Brassica oleracea* L. var. Italica) zbog povećane apsorpcije mikro- i makro- elemenata. Dakle, vjerojatno je da izlaganje LED rasvjeti povećava apsorpciju mikro- i makroelemenata iz gnojiva i na taj način povećava njegovu učinkovitost. Postoje dokazi da plavo LED svjetlo izaziva otvaranje ionskih kanala u membranama stanica (Amoozgar i sur. 2016) i na taj način omogućava ulazak i/ili izlazak iona iz stanice. Budući da se ove promjene javljaju kao odgovor na plavo svjetlo, može se pretpostaviti da u odgovoru sudjeluju fitokromi i kriptokromi - fotoreceptori koji apsorbiraju plavu svjetlost (Pevalek-Kozlina 2003). Plava LED svjetlost uzrokuje i povoljne morfološke promjene (Tamulaitis i sur. 2005, citirano u Amoozgar i sur. 2016) te i na taj način povećava apsorpciju mikro- i makroelemenata.

Za potvrdu pretpostavke ovisnosti fotosintetske učinkovitosti i parametara rasta (povećanja površine biljaka te smanjenja udjela suhe tvari) kod biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu pri LED rasvjeti potrebno je napraviti daljnja istraživanja kojima bi se utvrdilo doprinosi li promjena stope primanja mineralnih tvari opaženim učincima.

Na temelju istraživanja učinka dviju vrsta rasvjeta na vodenu leću (*Lemna minor* L.) koja je uzgajana 14 dana u dvije supkulture na dvije različite hranidbene podloge (podloga po Pirsonu i Seidelu i podloga po Steinbergu) mogu zaključiti da je rast biljaka bio bolji pri fluorescentnoj rasvjeti, a da je učinkovitost fotosinteze bila veća kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti. Spomenuti zaključak proizlazi iz sljedećih rezultata:.

1. Na parametre rasta je značajnije utjecao tip rasvjete nego vrsta podloge jer su prirast broja i mase biljaka, udio suhe tvari, prirast broja kolonija kao i površina biljaka bili veći pri fluorescentnoj rasvjeti. LED rasvjeta dovela je do povišenja sadržaja fotosintetskih pigmenata, a vrijednosti efektivnog prinosa fotosustava II, stope prijenosa elektrona i fotokemijskog gašenja ukazuju na to da je učinkovitost fotosinteze veća kod biljaka uzgajanih pri LED rasvjeti.

2. Koncentracija proteina i aktivnost enzima gvajakol peroksidaze su na podlozi po Pirsonu i Seidelu bili viši nego na podlozi po Steinbergu, što je naročito vidljivo u drugoj supkulturi. Na toj je podlozi izmjereno i značajno povećanje optimalnog prinosa fotosustava II ali samo u biljaka koje su uzgajane pri LED rasvjeti. Stoga mogu zaključiti da je na spomenute pokazatelje značajnije utjecao sastav hranjive podloge.

3. U drugom dijelu pokusa (u drugoj supkulturi, od 7. do 14. dana) utvrđena značajno viša količina pigmenata u biljaka izloženih LED rasvjeti u usporedbi s biljkama uzgajanim na fluorescentnoj rasvjeti. U biljaka uzgajanih na podlozi po Steinbergu i pri LED rasvjeti uočeno je značajno povećanje efektivnog prinosa fotosustava II i stope prijenosa elektrona u drugoj supkulturi. U tom je dijelu pokusa također dobivena viša vrijednost fotokemijskog gašenja u odnosu na prvi dio pokusa.

1. Amoozgar A, Mohammadi A, Sabzalia MR, (2016) Impact of light-emitting diode irradiation on the photosynthesis, phytochemical composition and mineral element content of lettuce cv. Grizzly. *Photosynthetica* 54, 10.1007/s11099-016-0216-8 (prihvaćeno za tisak)
2. Artetxe U, García-Plazaola JI, Hernández A, Becerril JM, (2002) Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. *Plant Physiol Biochem* 40:859-863
3. Babić M, Radić S, Cvjetko P, Rojec V, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M, (2009) Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium(I)-acetate. *Aquat Bot* 91:166–172
4. Bantis F, Ouzounis T, Radoglou K, (2016) Artificial LED lighting enhances growth characteristics and total phenolic content of *Ocimum basilicum*, but variably affects transplant success. *Sci Hortic* 198:277-283
5. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
6. Catesson AM, Imberty A, Goldberg R, Czaninski Y, (1986) Nature, localization and specificity of peroxidases involved in lignification process. U: Greppin H, Penel C, Gaspar Th, (ur) *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, 189-198, University of Geneva, Geneva
7. Folta KM, Koss LL, McMorro R, Kim HH, Kenitz JD, Wheeler R, Sager JC, (2005) Design and fabrications of adjustable red-green-blue LED light arrays for plant research. *BMC Plant Biol* 5:17
8. Gaspar Th, Penel C, Thrope T, Greppin H, (1982) *Peroxidases 1970-1980, A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants*. University of Geneva, Geneva
9. Gaspar Th, Penel C, Hagege D, Greppin H, (1991) *Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes*. U: Lobarzewski J, Greppin H, Penel C, Gaspar Th, (ur) *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, 249-280, University M. Curie-Sklodowska, Lublin, University of Geneva, Geneva

10. Genkov T, Tsoneva P, Ivanova I, (1997) Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in *in vitro* cultures of axillary buds of *dianthus caryophyllus* L. Plant Growth Regul 16:169-172
11. Glozer K, (2008) Protocol for leaf Image analysis – surface area, University of California, (<http://ucanr.edu/sites/fruittree/files/49325.pdf>)
12. Grambow HJ, (1986) Pathway and mechanism of the peroxidase-catalysed degradation of indole-3-acetic acid. U: Greppin H, Penel C, Gaspar Th, (ur) Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, 31-39, Geneva
13. Hillman WS, (1961) The *Lemnaceae*, or duckweeds. Bot Rev 27:221-287
14. ISO 20079:2005 Water quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test. International Organization for Standardization, Geneva
15. Keller T, (1974) The use of peroxidase activity for monitoring and mapping air pollution areas. Eur J For Path 4:11-19
16. Krajncić B, Devidé Z, (1980) Report on photoperiodic responses in *Lemnaceae* from Slovenia, Berichte des Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel, Zürich 47:75-86
17. Kopsell DA, Sams C, (2013) Increases in shoot tissue pigments, glucosinolates, and mineral elements in sprouting broccoli after exposure to short-duration blue light from light emitting diodes. J Amer Soc Hort Sci 138:31-37
18. Landolt E, (1986) The family of *Lemnaceae* - a monographic study (Vol. 1). Veröff Geobot Inst Eidgenöss Tech Hochsch Stift Rübel Zür, Zürich 71
19. Landolt E, Kandeler R, (1987) Biosystematic investigations in the family of duckweeds (*Lemnaceae*) (vol. 4), The family of *Lemnaceae* – A monographic study, vol.2. Veröff Geobot Inst, ETH, Zürich
20. Lichtenthaler HK, (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic membranes, Methods Enzymol 140:350-382
21. Lepeduš H, Cesar, V, Krsnik-Rasol, M, (2004) Guaiacol peroxidases in carrot (*Daucus carota* L.) root. Food Technol Biotechnol 42:33–36

22. Lozić I, (2010) Učinak različitih osvjetljenja na rast i fotosintezu vodene leće (*Lemna minor* L.), Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
23. Maxwell K, Johnson G N, (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide, J Exp Bot 51:659-668
24. Ostroumov EE, Mulvaney RM, Cogdell RJ, Scholes GD, (2013) Broadband 2D electronic spectroscopy reveals a carotenoid dark state in purple bacteria. Science, 340:52
25. Pevalek-Kozllina B, (2003) Fiziologija bilja, Profil, Zagreb
26. Pirson A, Seidel F, (1950) Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Calciummangel (Cell metabolism and physiology in *Lemna minor* root deprived of potassium and calcium, in German). Planta 38:431–473
27. Pütter J, Becker R, 1983, Peroxidases, U: Bergmeyer HU, (ur) Methods of Enzymatic Analysis, Weinheim: Verlag Chemie, 286-292
28. Radić S, Stipanićev D, Cvjetko P, Lovrenčić Mikelić I, Marijanović Rajčić M, Širac S, Pevalek-Kozllina B, Pavlica M, (2009) Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism, Ecotoxicology 19:216-222
29. Repka V, Vanek G, (1993) Characterization of the stress-related, extracellular anionic peroxidases from cucumber. U: Welinder KG, Rasmussen SK, Penel C, Greppin H, (ur), Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology, 355-360, University of Geneva, Geneva
30. Schwarz D, Dimpl E, Bandlamudi GC, Blunck M, (2009) Lightning technologies, GTZ, Eschborn (https://www.uni-oldenburg.de/fileadmin/user_upload/physik-ppre/download/Downloads/Lighting_Technologies_1.pdf)
31. Severi A, (1991) Effects of aluminium on some morphophysiological aspects on *Lemna minor* L. Atti. Soc. Nat. e Mat. di Modena 122:95-108

32. Sharrock RA, Quail PH, (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family, Genes Dev 3:1745-1757 (<http://genesdev.cshlp.org/content/3/11/1745.full.pdf>)
33. Siegel SM, Siegel BZ, (1986) Peroxidase activity and stress: A complex relationship. U: Greppin H, Penel C, Gaspar Th (ur) Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. 427-431, University of Geneva, Geneva
34. Singh D, Basu C, Meinhardt–Wollweber M, Roth B, (2014) LEDs for Energy Efficient Greenhouse Lighting, Hannover, Hannover Centre for Optical Technologies (https://www.researchgate.net/publication/263091526_LEDs_for_Energy_Efficient_Greenhouse_Lighting)
35. Smith S, Kwan KH, (1989) Use of aquatic macrophytes as a bioassay method to assess relative toxicity, uptake kinetics and accumulated forms of trace metals. Hydrobiologia 188/189:345-351
36. Sorić S, (2011) Ovisnost rasta i fotosinteze vodene leće (*Lemna minor* L.) o osmotskoj vrijednosti podloge i osvjetljenju. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
37. Šarić M, (2001) Utjecaj kadmija na vodenu leću (*Lemna minor* L.) u uvjetima *in vitro*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
38. Tamulaitis G, Duchovskis P, Bliznikas Z, Breive K, Ulinskaite R, Brazaityte A, Novickovas A, Zukauskas A, (2005) High-power lightemitting diode based facility for plant cultivation. J Phys Appl Phys 38:3182-3187
39. Thomas SA, Dunn S, (1967) Plant growth with new fluorescent lamps I. fresh and dry weight yields of tomato seedlings. Planta 72:198-207
40. Van Assche F, Clijsters H, (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ 13:195-206
41. Vidaković–Cifrek Ž, Pevalek–Kozlina B, Tkalec M, Babić M, Radić Brkanac S, (2014) Praktikum iz fiziologije bilja, skripta za internu upotrebu. Prirodoslovno–matematički fakultet, Zagreb

42. Vidaković–Cifrek, Ž. (1999) Učinak kalcij (II) klorida i kalcij (II) bromida na fiziološke procese u vodenoj leći (*Lemna minor* L.) i korijenu luka (*Allium ascalonicum* auct.). Doktorska disertacija. Zagreb. Prirodoslovno–matematički fakultet
43. Vierling E, (1997) The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiol Plant* 19:539-547
44. Wang W, (1986) Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environ Pollut (Series B)* 11:1-14.
45. Wang W, (1990) Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ Res* 52:7-22
46. Waters ER, Lee GJ, Vierling E, (1996) Evolution, structure and function of small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* 47:325-338
47. Weckx J, Clijsters, HMM, (1997) Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* 35:405-410
48. Welch WJ, (1993) How cells respond to stress. *Sci Am* 268:34-41
49. Zhang J, Kirkham MB, (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol* 35:785-791
50. Apogee Instruments, Conversion - PPF to Lux, 2007, Utah State University in Logan, Utah, <http://www.apogeeinstruments.co.uk/conversion-ppf-to-lux/>
51. LZMK, Enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža, Fluorescentna cijev, 1999a, Zagreb, posjećeno 9 svibnja 2016, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=19966>
52. LZMK, Enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža, Peroksidaze, 1999a, Zagreb, posjećeno 28 travnja 2016, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=47697>
53. LZMK, Enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža, Svjetleća dioda, 1999c, Zagreb, posjećeno 13 travnja 2016, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=59111>

- 54.LZMK, Enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža, Svjetlost, 1999d, Zagreb, posjećeno 9 svibnja 2016, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=59121>
- 55.Ekološka rasvjeta, Temperatura svjetla, 2014, Zagreb, posjećeno 9 svibnja 2016, <http://www.ekorasvjeta.net/javna-rasvjeta/temperatura-svjetla/>
- 56.Proleksis enciklopedija, Svjetlost, 2009, Zagreb, posjećeno 9 svibnja 2016, <http://proleksis.lzmk.hr/45413/>

Moje ime je Ana – Maria – Beatrice Šikić, rođena sam 16. rujna 1992. u Varaždinu. Živim u Varaždinskim Toplicama, a studiram u Zagrebu. Od 1999. do 2007. pohađala sam Osnovnu školu Antuna i Ivana Kukuljevića u Varaždinskim Toplicama. 2007. godine upisala sam Prvu gimnaziju Varaždin koju sam pohađala do 2011. godine.

2011. godine sam upisala Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije, nastavnički smjer. Sudjelovala sam na manifestaciji „Noć biologije“ 2012. i 2013. godine te na manifestaciji „Otvoreni dan kemije“ 2014., 2015. i 2016. godine. Na završnoj godini studija pohađala sam metodičku praksu nastave biologije u XV gimnaziji u Zagrebu te metodičku praksu kemije u VI osnovnoj školi u Varaždinu.

Tijekom studija razvila sam sklonost k botanici, nešto više nego prema ostalim granama biologije, ali i još više ka kemiji. Zbog toga sam se odlučila na izradu diplomskog rada u Laboratoriju za fiziologiju bilja, jer proučavanje biljne fiziologije obuhvaća moje interese.